

活性汚泥構成細菌による  
アシル化ホモセリンラクトン  
合成および分解機構の解析

127104A 落合 聖史

指導教員

池田 宰 教授

諸星 知広 准教授

システム創成工学専攻

宇都宮大学

## 目次

第1章 序論	6
1.1. Quorum sensing (QS)	6
1.1.1. 概要	6
1.1.2. QS 研究についての歴史	6
1.1.3. オートインデューサー(AI)について	7
1.1.4. アシル化ホモセリンラクトン(AHL)について	10
1.1.5. AHL による QS 制御機構	11
1.1.6. QS 制御の意義	12
1.1.7. QS 研究の意義～応用科学分野における利用～	12
1.2. Quorum Quenching (QQ)	13
1.2.1. 概要	13
1.2.2. QQ のメカニズム	13
1.2.2.1. 包接化	13
1.2.2.2. 拮抗阻害	13
1.2.2.3. 化学構造変化	14
1.2.2.4. その他の QQ 手法	14
1.2.3. まとめ	14
1.3. 生物学的な水処理	14
1.3.1. 緒言～水環境問題～	14
1.3.2. 活性汚泥法	15
1.3.2.1. 活性汚泥と活性汚泥法	15
1.3.2.2. 活性汚泥法の歴史	16
1.3.2.3. 活性汚泥法の分類	16
1.3.2.4. 活性汚泥法の課題	19
1.3.3. 膜分離法	20
1.3.3.1. 緒言	20
1.3.3.2. 膜の分類	20
1.3.3.3. 膜分離法の課題	21
1.3.4. 活性汚泥法と膜分離法	21
1.3.4.1. 膜分離活性汚泥法	21
1.3.4.2. 三次処理としての膜分離	22
1.3.5. まとめ	22
1.4. 生物学的な水処理と QS	22
1.4.1. 概要	22

1.4.2. 活性汚泥と QS .....	23
1.4.3. 既往の研究 .....	23
1.5. 研究の目的 .....	26
第2章 使用菌株・プラスミド・試薬および機器 .....	32
2.1. 使用菌株・プラスミド .....	32
2.2. 試薬類 .....	33
2.3. 使用機器 .....	34
第3章 アシル化ホモセリンラクトン合成細菌の解析 .....	36
3.1. 緒言 .....	36
3.1.1. AHL 合成細菌とバイオフィーム .....	36
3.1.2. バイオフィームについて .....	36
3.1.2.1. バイオフィームとは .....	36
3.1.2.2. バイオフィームのライフサイクル .....	36
3.1.3. バイオフィーム対策技術 .....	37
3.1.3.1. 物質の添加もしくは制限 .....	37
3.1.3.2. 動電学的手法 .....	39
3.1.3.3. 膜改質・膜洗浄 .....	40
3.1.3.4. モジュールデザイン・運転条件の最適化 .....	41
3.1.3.5. 微生物制御 .....	41
3.1.4. バイオフィームと QS .....	42
3.1.4.1. 既往の研究 .....	42
3.1.4.2. バイオフィーム評価法 .....	43
3.1.5. 研究の目的 .....	44
3.2. サンプリングと AHL 合成細菌スクリーニング .....	45
3.2.1. 菌のサンプリングと単離 .....	45
3.2.2. AHL 合成細菌のスクリーニングと菌の選定 .....	45
3.3. AHL 合成遺伝子破壊株の作製と確認 .....	47
3.3.1. AHL 合成遺伝子破壊株の作製 .....	47
3.3.2. AHL 合成遺伝子破壊株の確認 .....	47
3.4. バイオフィーム評価試験～概要と実験準備～ .....	50
3.4.1. 緒言と実験概要 .....	50
3.4.3. 実験準備～菌体増殖の確認～ .....	50
3.5. 96 穴プレートを用いたバイオフィーム定量試験 .....	53
3.5.1. 実験方法 .....	53
3.5.2. 実験結果と考察 .....	53
3.6. カバーガラスを用いたバイオフィーム評価試験 .....	55

3.6.1. 実験方法 .....	55
3.6.2. 実験結果 .....	56
3.6.3. 考察 .....	65
3.7. まとめ .....	68
第4章 アシル化ホモセリンラクトン分解細菌の解析 .....	73
4.1. AHL 分解細菌概要 .....	73
4.1.1. 研究の目的 .....	73
4.1.2. 既知の AHL 分解機構 .....	73
4.1.2.1. AHL ラクトナーゼの分解メカニズム .....	74
4.1.2.2. AHL アシラーゼの分解メカニズム .....	74
4.1.3. AHL 分解細菌の意義 .....	75
4.1.3.1. AHL をエネルギー源として資化 .....	75
4.1.3.2. 他の細菌の QS を不活性化 .....	76
4.1.3.3. AHL を毒性物質とみなして分解 .....	77
4.2. AHL 分解活性評価と調査対象菌の選定 .....	79
4.2.1. 緒言 .....	79
4.2.2. 実験方法 .....	79
4.2.3. 実験結果と菌の選定 .....	80
4.3. Ooi24 株の AHL 分解機構解析 .....	82
4.3.1. 緒言 .....	82
4.3.2. 実験方法 .....	82
4.3.3. 実験結果 .....	82
4.4. Ooi24 株の AHL 分解遺伝子スクリーニング .....	83
4.4.1. 緒言 .....	83
4.4.2. 遺伝子ライブラリー作製 .....	84
4.4.3. AHL 分解遺伝子スクリーニング .....	85
4.4.4. シーケンスの結果 .....	87
4.4.5. 補足 ～ブルーホワイトアッセイ～ .....	88
4.5. AmiE の AHL 分解機構解析 .....	90
4.5.1. 緒言 .....	90
4.5.2. 実験方法 .....	91
4.5.3. 実験結果と考察 .....	91
4.6. 系統解析 .....	94
4.6.1. AmiE の系統解析 .....	94
4.6.2. <i>Acinetobacter</i> 属細菌の 16S rRNA 系統解析 .....	95
4.6.3. 補足 ～トランスポゾンについて～ .....	97

4.7. AmiE の各種 AHL に対する分解活性.....	98
4.7.1. 緒言と実験方法.....	98
4.7.2. 実験結果.....	98
4.8. <i>P. aeruginosa</i> のエラスターゼ活性への AmiE の影響.....	100
4.8.1. 緒言と実験方法.....	100
4.8.2. 実験結果.....	101
4.9. まとめ.....	103
第5章 結論.....	108
5.1. 本研究のまとめ.....	108
5.2. 今後の展望.....	108
5.2.1. AHL 合成細菌（バイオフィーム）について.....	108
5.2.2. AHL 分解細菌（AHL アシラーゼ）について.....	109
謝辞.....	110
APPENDIX.....	111
A. 第3章 シクロデキストリンを用いたバイオフィーム形成抑制試験.....	111
A.1. 概要.....	111
A.2. シクロデキストリンについて.....	111
A.3. CD による AHL の包接化.....	112
A.4. 実験方法.....	112
A.5. 実験結果と考察.....	112
A.6. 備考 ～CD の添加と菌体増殖～.....	114
B. 第3章 バイオフィーム膜厚および表面被覆率の概算.....	117
B.1. 概要.....	117
B.2. バイオフィーム膜厚算出法.....	117
B.3. 表面被覆率算出法.....	120
B.4. 結果.....	121

## PUBLICATIONS

### 1. Journal

[1-1] Seiji Ochiai, Sera Yasumoto, Tomohiro Morohoshi, Tsukasa Ikeda, “AmiE, a Novel *N*-Acylhomoserine Lactone Acylase Belonging to the Amidase Family, from the Activated-Sludge Isolate *Acinetobacter* sp. Strain Ooi24” *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.80, No.22, pp.6919-6925, 2014.

[1-2] Seiji Ochiai, Tomohiro Morohoshi, Ayane Kurabeishi, Masahiro Shinozaki, Haruka Fujita, Isao Sawada, Tsukasa Ikeda, “Production and Degradation of *N*-Acylhomoserine Lactone Quorum Sensing Signal Molecules in Bacteria Isolated from Activated Sludge” *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, Vol.77, No.12, pp.2436-2440, 2013.

### 2. Proceeding

[2-1] Seiji Ochiai, Kazuki Yamada, Takaki Azuma, Miwa Ishizuka, Tomohiro Morohoshi, Tsukasa Ikeda, “Quorum sensing and biofilm formation of *Aeromonas hydrophila* isolated from activated sludge treatment system” *Proc. of 11<sup>th</sup> International Symposium on Southeast Asian Water Environment (SEAWE11)*, pp.354-359, Nov. 2014.

# 第 1 章 序論

## 1.1. Quorum sensing (QS)

### 1.1.1. 概要

細菌は、他の多くの生き物と同様に相互にコミュニケーションをとり、コミュニティを形成する。これは Quorum sensing (QS) と呼ばれ、自分と同種の菌の菌体密度を感知して物質の産生等を行う機構として知られている。QS 制御には、多くの細菌が化学物質をシグナルとして用いていることが明らかとなっている<sup>[1]</sup>。この化学物質シグナルのことをオートインデューサー (Autoinducer, AI) と呼ぶ。AI の種類は細菌により様々であるが、中でもグラム陽性細菌が用いる小ペプチド分子やグラム陰性細菌が用いるアシル化ホモセリンラクトン (*N*-acyl-L-homoserine lactone, AHL) によるシグナリングシステムは広く研究されている。本研究では後者の AHL に着目している。AI および AHL については、本節の後半にて詳しく述べることとする。

### 1.1.2. QS 研究についての歴史

QS の概念が浸透したのは 1990 年以降であるが、その現象に関連した研究は、古くは 1970 年代まで遡る。生物発光細菌である *Vibrio (Photobacterium) fischeri* をフラスコ中で培養したときに、培養初期では全く発光を示さないにもかかわらず、対数増殖期後期から急激に発光を示すことに関心が寄せられ、この現象は遺伝子レベルにおける「自己誘導」であるとされた<sup>[2]</sup>。その後、*V. fischeri* や別の発光細菌である *Vibrio harveyi* が AI と呼ばれる化学物質を生産していることや、それらの細菌が互いの発光を助長せず、種に特異的なシグナルによって制御されていることなどが明らかとなった<sup>[3]</sup>。1970 年台の終わりには、*V. harveyi* の発光を促進する複数のグラム陰性細菌の存在が明らかとなり、細胞間シグナリングが菌種内だけでなく菌種間でも起こりうる現象であることが示唆された<sup>[4]</sup>。

1980 年代に入り、*V. fischeri* の培養上澄み液より AI が分離・精製され、それが AHL の一種である 3OC6-HSL (*N*-3-oxohexanoyl-L-homoserine lactone) であることが初めて確認された<sup>[5]</sup>。遺伝子解析も進み、発光に必要な 7 つの遺伝子 (*luxI*, *luxR*, *luxA*, *luxB*, *luxC*, *luxD*, *luxE*) が特定され、*lux* 遺伝子群 (オペロン) として定義された<sup>[6]</sup>。この遺伝子群をクローニングした *Escherichia coli* も菌体密度依存性の発光を示し、遺伝子発現等の調査ツールとしての *E. coli* の有用性が示唆された<sup>[7]</sup>。また、このシグナル物質が受動拡散によって細胞膜内外

を自由に透過することが分かった<sup>[8]</sup>。これはシグナル物質の感知にかかわるタンパク質が細胞内に留まっても、外部環境のシグナル物質濃度を感知可能であることを意味する。また、この頃には発光遺伝子の発現因子として AI による誘導以外にもいくつか要因が発見されている。例えば、cyclic AMP (cAMP)<sup>[9]</sup>による発光の発現や鉄による発現の抑制<sup>[10]</sup>が判明している。

1990年代に入り、QS が多くのグラム陰性細菌で行われていることが明らかとなってきた。その先駆けとして LuxR の同族体では、*Pseudomonas aeruginosa* について LasR が<sup>[11]</sup>、*Agrobacterium tumefaciens* について TraR が<sup>[12]</sup>、それぞれ発見された。それに関連した AI の研究も進み、両者とも *V. fischeri* が生産する AHL と類似したシグナルを生産することや、それが LuxI の同族体によって合成されていることが明らかとなった。*P. aeruginosa* については、少なくとも 2 種類の AI によって QS 制御が行われていることも判明した<sup>[13]</sup>。1990年代半ばまでには、*Erwinia cartovora* や *Rhizobium leguminosarum*, *E. coli* などの細菌についても LuxI/LuxR システムに相同の制御機構が確認されている<sup>[14]</sup>。これらの同族体についてのレビューにおいて、“Quorum Sensing”という用語が初めて使用された<sup>[14]</sup>。

QS の現象が初めて発見されてから 40 年以上が経過している。多くの細菌が QS 機構を有することが分かってきており、多くの研究者の間で QS の重要性も認識されてきた。とはいえ、微生物それ自体も含めてその自然環境での生態やそれを形作る上での QS の役割など、未解明の部分は非常に多い。本研究と関連する部分で具体例を挙げるならば、QS シグナル物質を分解する細菌の社会的役割や、種々の細菌の QS がバイオフィーム形成に与える影響などもそれに含まれる。QS に関連した研究分野は微生物社会学 (Sociomicrobiology)とも呼ばれつつあり<sup>[15]</sup>、遺伝子解析技術や微生物環境の経時的・非破壊的観察技術の進歩に伴い、今後ますます発展していくものと思われる。

### 1.1.3. オートインデューサー(AI)について

QS が明らかになって以来、今日までに多岐に渡る AI が発見されてきた。その細菌への作用機構も様々であり、細胞表面の膜タンパクにはたらきかけて間接的に情報伝達を行うものもあれば、細胞膜を能動的もしくは受動的に透過して遺伝子制御に直接関わるものもある。また、AI の蓄積により遺伝子の発現が活性化されるものもあれば、逆に抑制されるものもある。菌種内コミュニケーションに用いられるものもあれば、菌種間コミュニケーションに用いられるものもある<sup>[16]</sup>。本節では、多様に存在する AI の一部と、それを利用



する菌種および影響を与える因子について紹介する。

AI-2 は種間コミュニケーションに活用されており、4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD) およびそこから派生した物質全般を指す<sup>[17]</sup>。現在までで 70 種類以上の AI-2 生産菌が報告されており、*Campylobacter* 属細菌など、多種類の病原性発現の制御に関わることが分かっている<sup>[18]</sup>。

多くの細菌により生産される indole も種間コミュニケーションシグナルとして知られる。7-hydroxyindole は *Escherichia coli* O157:H7 株のバイオフィーム形成を抑制する一方、*P. aeruginosa* のバイオフィーム形成を促進する<sup>[19]</sup>。

*Bacillus subtilis* の生産する surfactin などの小分子は、細胞膜からのカリウム漏出を誘導することで、バイオフィーム形成にかかわる遺伝子発現を制御する膜タンパク質キナーゼ (KinC) の活性を促進する<sup>[20]</sup>。細菌が分泌するこれらの小分子を Shroff らは Natural Small Molecule (NSM) と定義している<sup>[16]</sup>。同様の効果は *Streptomyces noursei* が生産する nystatin によっても確認された<sup>[20]</sup>。KinC の活性は NSM によるカリウム漏出によって制御されるだけでなく、カリウム漏出機能を持たないリポペプチド化合物 bacillomycin D によっても活性化されており (詳しい機構は不明)<sup>[21]</sup>、この遺伝子発現の制御にカリウム漏出が必須でないことが分かる。

Diffusible Signal Factor (DSF) は *Xanthomonas* spp. などの細菌で用いられる長鎖脂肪酸のシグナル物質である<sup>[22]</sup>。*X. campestris* では複数の遺伝子が DSF を介して正または負に制御されており、EPS の生産や凝集、バイオフィームの形成や脱離に影響を与える<sup>[23]</sup>。

*P. aeruginosa* は AHL を介して QS 制御を行う代表的な細菌であるが、AHL 以外にも 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (*Pseudomonas* Quinolone Signal, PQS) を生産し、バイオフィーム形成を制御するとともに、脱室にも寄与することが知られている<sup>[24]</sup>。

Fig. 1-1 は AI の構造式を示したものである。本節で紹介していない AI のほか、まだ発見されていないような AI も多数存在するものと思われる。

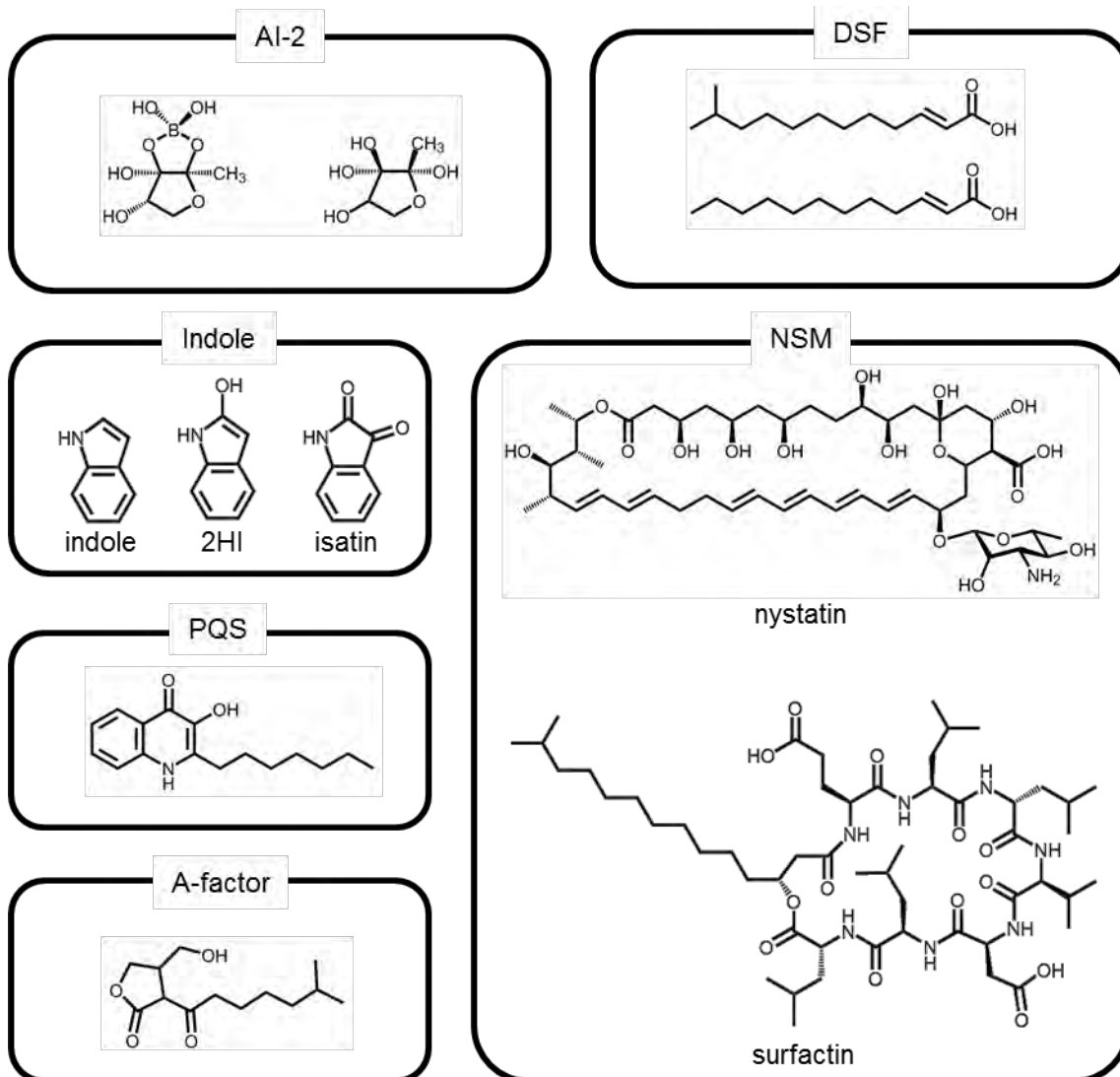


Fig. 1-1 Chemical structure of various autoinducers used in QS regulation

#### 1.1.4.アシル化ホモセリンラクトン(AHL)について

多くのグラム陰性細菌がQSシグナル物質としてAHLを生産することが今日までに明らかになっている。AHLはホモセリンラクトン(HSL)にアシル鎖が結合した形をとる。アシル鎖は通常C4~C18の範囲で合成され、これに3-oxo体や3-hydroxy体のほか、鎖末端がメチル化されたものや鎖が不飽和化したものが存在する<sup>[25]</sup>。上記AHLのうち、いくつかの構造式をFig. 1-2に示す。

このように、AHLの種類は複数存在し、その表記の仕方も論文によって様々である。AHL自体、acyl-HSL<sup>[1]</sup>やAI-1<sup>[17]</sup>と表記する論文もある。また、アシル鎖の炭素数が10の3-oxo体AHLを例にとっても、3OC10-HSL<sup>[1]</sup>や3-oxo-C10HSL<sup>[25]</sup>、炭素鎖の数字を下付きにした3-oxo-C<sub>10</sub>-HSL<sup>[26]</sup>、または*N*-3-oxodecanoyl-*L*-homoserine lactone<sup>[17]</sup>と略さずに記述する場合もある。以下、本論文ではアシル化ホモセリンラクトン全般を指す場合はAHL、個々のAHLについてはC4-HSLや3OC10-HSLのように表記することとする。

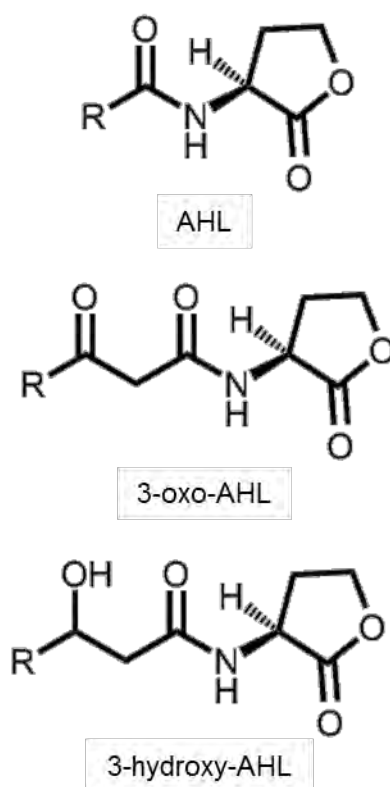


Fig. 1-2 Chemical structure of representative AHLs

### 1.1.5. AHL による QS 制御機構

AHL による QS 制御では、以下の 3 つの物質が主要な役割を果たす。

- AHL
- AHL を合成するための合成タンパク質 (I タンパク質)
- AHL 濃度に応答して遺伝子発現を制御する調節タンパク質 (R タンパク質)

基本的には AHL 合成遺伝子によりコードされた AHL 合成タンパク質が AHL を合成し、合成された AHL が調節タンパク質に結合して調節遺伝子にはたらきかけることによって各種遺伝子の転写が活性化もしくは抑制される<sup>[25]</sup>。その制御機構は様々である。代表的な例として、I タンパク質により生産された AHL が R タンパク質と結合し、それが遺伝子転写を活性化させる *V. fischeri* の LuxI / LuxR システムが挙げられる。

LuxR…250 ほどのアミノ酸からなり、N 末端から 160 ほどのアミノ酸で構成されたポリペプチドは AHL 結合部位として(regulator domain)、C 末端から 90 ほどのアミノ酸の領域は DNA 結合部位および転写活性因子で構成(activator domain)されている。AHL 結合部位は、AHL 濃度が不十分である場合は DNA 結合部位に干渉し、*luxR* 遺伝子への結合を阻害している。結果的に、発光にかかわる遺伝子発現の活性がなくなる。

LuxI…LuxI タンパク質は 193 のアミノ酸からなり、N 末端から 25 ~ 104 の間がアミド結合形成用の活性サイトとして機能する。この部位が acyl-acyl carrier protein (acyl-ACP) および S-アデノシルメチオニン(S-adenosylmethionine, SAM)の結合に関与する。前者のアシル鎖部が SAM とアミド結合を形成し、acyl-SAM となる。その後、SAM より 5'-methylthioadenosine (MTA)が切り離される。残った部分がラクトン環を形成し、AHL となる。

これとは逆に、*Pantoea stewartii* の EsaI / EsaR システムでは AHL と結合した R タンパク質が遺伝子転写を抑制する。*P. aeruginosa* の QS 制御は広く研究されており、複数のシステムが存在することが知られている。現時点では、3OC12-HSL を生産し、それにより制御される LasI / LasR システムと、C4-HSL を生産し、それにより制御される RhII / RhIR システムに加え、外部からの AHL によっても転写が活性化される QscR システムの存在が判明している。さらに、LasI / LasR システムの活性化により RhIR タンパク質が生産され、それが RhII / RhIR システムの活性化に繋がるというように、一方のシステムが他方へのフィードバック機能としてもはたらいている。

### 1.1.6. QS 制御の意義

QS により制御される機能については、今日までに多くの報告がなされている。日和見感染細菌である *P. aeruginosa* は QS によって病原性発現に関連する多くの遺伝子制御を行っており、QS が活性化することによって酵素や毒素の産生を行う。その他、発光や色素に関連した物質の産生を行う細菌、細胞外多糖の分泌を活性化させる細菌、プラスミドの接合伝達を促進する細菌などが存在する。

遺伝子発現・機能発現が QS により制御されることで、一定の菌体密度に達した段階ではじめてそれらにかかわる物質の産生等が行われる。病原性細菌に関しては、菌体密度が低い段階におけるこれらの物質産生を行わないことにより、周辺に存在する敵に対して免疫学的な対応期間を与えないようにする狙いがあると考えられている。また、細胞外多糖の産生については、第3章で後述するバイオフィルムの形成と関係している。菌体密度が低い状態でこれらの物質産生を行っても、系外へ拡散しやすく有効活用できないため、周囲の菌体密度が高くなるまであえて物質産生を行わないことで、不要なエネルギー消費を抑制していると考えられている。*V. fischeri* に代表される発光バクテリアについても同様のコンセプトで制御を行っているとの考え方ができる。これらの細菌は浮遊状態の場合と、特定の宿主と共生関係を築いている場合があり、後者の高菌体密度場においてのみ発光する。その役割については諸説あるが、QS による発光が宿主に獲物を捕獲させるための誘導灯のような役割を果たしているとする説がある。一方で、ダンゴイカ *Euprymna scolopes* は *V. fischeri* の発光量を月明かりと同程度に調節することで、海底にできる自らの影を消し、敵に気づかれないように工夫しているとの説もある<sup>[27]</sup>。いずれも宿主の生存を助けることで自らの生存率を上げる戦略と捉えることができる。

### 1.1.7. QS 研究の意義～応用科学分野における利用～

近年、薬剤や抗生物質耐性菌の出現と蔓延が問題となってきている。細菌は細胞間のプラスミド伝達や死細胞由来の浮遊 DNA による伝達、ウイルス運搬により新たな耐性を獲得する<sup>[28]</sup>。病院や農場等で用いられた抗生物質が排水中に残留し、それが広く環境中に流出していることもあり、今後は環境中でもそのような耐性菌の増加が懸念される。QS を制御することにより、病原菌が定足数に達していても病原性の発現を抑制することができると考えられる。これは抗生物質等を用いる方法と異なり耐性獲得の心配がなく、抗生物質に代わる病原性抑制手段として期待されている。

ほかにも、バイオフィームと呼ばれる微生物膜の制御の面でも QS の知見が有用となる。QS の活性化や抑制をすることで、望ましい／望ましくない機能発現の促進／抑制を狙うことができる。

## 1.2. Quorum Quenching (QQ)

### 1.2.1. 概要

QS が AHL を介して制御されていることから、何らかの方法で AHL のはたらきを抑止することで QS を阻害することができる。近年ではこの阻害に関する現象を総称して Quorum Quenching (QQ) と呼ぶことが多い。前節で示したとおり、医学、薬学、環境工学等の応用科学分野における QS 制御において、QQ 技術の活用は非常に重要であるといえる。また、自然界においては高等植物や微生物が他の微生物集団のはたらきを制御するために QQ を活用している可能性が示唆されている。本節では AHL を介した QS を対象に、それに対する QQ がどのような形で行われるか、そのメカニズムを紹介する。

### 1.2.2. QQ のメカニズム

#### 1.2.2.1. 包接化

QS は AHL などのシグナル物質が R タンパク質に結合することで、その後の転写活性へと繋がるため、AHL の結合部位が立体的に阻害されていれば結合は起こらず、QS も不活性のままとなる。これを狙い、AHL を包接化することで QQ が可能である。

本研究グループでは、シクロデキストリン(Cyclodextrin, CD)が AHL を包接することにより QS を阻害する<sup>[29]</sup>ことを示し、さらに CD の修飾化合物を合成し、それを包接剤とした AHL の不活性化<sup>[30, 31]</sup>や、CD 固定化シートを用いた QS 阻害<sup>[32, 33]</sup>などの研究を実施している。

#### 1.2.2.2. 拮抗阻害

AHL と類似した化合物の中には、R タンパク質には結合するが、その後の転写活性を持たないものが存在する。これを系内に混入させることで AI と R タンパク質の結合を相対的に抑制する方法である。高等植物は種々の AHL 類似化合物を生産しており、それらの一部は AHL を介した QS を抑制する効果があることが確認されている（なお、QS を活性化させるものも存在している）<sup>[34]</sup>。

### 1.2.2.3. 化学構造変化

生産された AHL に対して修飾反応・分解反応などの化学変化を引き起こすことにより、AHL を不活性化することができる。AHL 分解反応として、現在までに AHL ラクトナーゼと AHL アシラーゼによる分解反応が報告されている。これについては第 4 章に記す。また、修飾反応としてオキシダーゼやオキシリダクターゼによるものがある。*Bacillus megaterium* CYP102A1 株が有するオキシダーゼによる生成物の QS 活性は完全にはなくならないが、元の AHL と比べて 18 分の 1 程度にまで下落したとする報告がある<sup>[35]</sup>。また、*Rhodococcus erythropolis* W2 株が有するオキシリダクターゼは AHL 等の 3-oxo 部をヒドロキシ基に還元するが、この反応自体は QS の不活性化に繋がらず、その後の代謝反応が進行することにより初めて QS 不活性となることが明らかとなっている<sup>[36]</sup>。

### 1.2.2.4. その他の QQ 手法

上記以外にも、例えば I タンパク質や R タンパク質の生産や機能を阻害することができれば QS 阻害に繋がると考えられる。それらの生産に関連した遺伝子の破壊株を作製して野生株と比較する手法は、本研究も含めて微生物の各種機能解析手段として大いに利用されている。

### 1.2.3. まとめ

QQ は以上のような、多様なメカニズムに基づき活用されている、もしくはその可能性がある。とりわけ自然界では拮抗阻害や AHL 分解反応を用いた QQ が多く、日進月歩で新しい機能を持った細菌や酵素が発見されている。本研究でも第 4 章において、活性汚泥から単離した AHL 分解細菌の機能解析を実施しており、これにより生産される酵素が QQ 手段のひとつとして活用可能であることが期待される。

## 1.3. 生物学的水処理

### 1.3.1. 緒言～水環境問題～

水資源は社会と生態系の双方にとって重要なものである。私たちは自らの健康維持のためにクリーンな飲料水が必要であり、社会的には農業・工業・エネルギー生産・航行・娯楽などの分野すべてにおいて水が必要である。しかし、これらの水資源が得られる資源地

には年々ストレスが加えられ、気候変動と相まってその水質は悪化傾向にある。

近年の気候変動は、多くの地域で水の供給が縮小される傾向をもたらしており、既にアメリカ西部においては、直近 50 年間における降水量の減少とそれに伴う干ばつの増加という形で影響が出始めている。また、水不足が比較的問題にならない地域においては、逆に洪水などの水災害の増加による水資源の輸送インフラへのダメージや、海面上昇による周辺淡水資源への影響が懸念されている。いずれの場合も人々にとって安全で使用可能な水資源の確保が脅かされることになる<sup>[37]</sup>。

一方で、今後水に対する需要はさらに増加すると予測されている。世界全体の水の使用比率を大雑把に平均すると、農業用水が約 70%、工業用水が約 20%、生活用水が約 10%である。このうち、農業用水の使用量は 2050 年までに 20%増加すると見込まれている（効率の改善がない場合）。また、工業用水のうち、75%（すなわち全体の 15%）はエネルギー産業であるが、このエネルギー需要も 2010 年～2035 年までの間に途上国を中心に 1/3 以上が増加すると見込まれている。エネルギー生産には冷却水など水の使用が不可欠であることから、エネルギー需要の増加は結果的に水の消費量の増加となる<sup>[37]</sup>。

今後、私たちがこれらの水資源を安定的に確保するためには、気候変動による資源地へのストレスの軽減はもちろんのこと、人工的に汚染された水を浄化・再利用するための水処理技術の発展が不可欠である。水処理は物理・化学・電気・生物など様々な分野の知識・技術をベースとしており、様々な分野へのアプリケーションが検討・実施されている。本研究では調査対象菌のサンプリング先として、生物学的水処理法のひとつである活性汚泥法および関連する工程を対象としている。次節以降、活性汚泥法および活性汚泥法と組み合わせられて用いられることが多い膜分離法について紹介し、それぞれの課題について記述する。

### 1.3.2. 活性汚泥法

#### 1.3.2.1. 活性汚泥と活性汚泥法

活性汚泥は多数の好気性微生物や有機・無機性の浮遊物質などから成るゼラチン状のフロックであり、排水中に含まれる有機物を吸着して酸化する能力、および凝集して沈降分離する能力に優れる。その生物相は細菌が主体であるが、真菌類、藻類、原生動物、微小な後生動物などから構成されている。標準的な活性汚泥フロック径は操業条件により 1～600  $\mu\text{m}$  程度であり、粒径数  $\mu\text{m}$  の粒子が凝集して 10  $\mu\text{m}$  程度のマイクロフロックを形成し、さらにそれらが凝集して平均 100  $\mu\text{m}$  超のマクロフロックとして存在するとされ



ている<sup>[38]</sup>。このようなマクロフロックは、外部からの剪断や超音波などで解体された場合でも、1hほど静置しておくで再度凝集し、元のフロック径を取り戻す<sup>[39]</sup>。

活性汚泥法は排水がスクリーニングや浮上・沈降などにより一次処理された後の二次処理法として位置づけられており、これらによる排水中の有機物除去と、それに伴う活性汚泥の増殖および自己酸化が複雑に行われることで、排水処理が進行していく。活性汚泥法は、特に生活排水に対して高い浄化能力があり、かつ比較的安価に運転管理が可能であることから、先進各国の下水処理に活用されている。

### 1.3.2.2. 活性汚泥法の歴史

活性汚泥法の歴史は古く、その基礎となる研究が開始されたのは1882年のことである。その後、1910年代にはアメリカやイギリスで活性汚泥法が実用レベルまで確立されている。

日本では1930年に最初の活性汚泥法による下水処理場が名古屋で運転開始された。1971年には本田技研工業により、日本で最初の活性汚泥方式の総合排水処理場が建設された。

前述のとおり、現在ではもっとも広く普及している排水処理技術となっている。その間、目的の処理対象物質やその濃度・流量等に応じて様々な活性汚泥法の変法が提案されてきた。次節でその変法について、概略を記述する。

### 1.3.2.3. 活性汚泥法の分類

#### ① 好気処理法

好気処理法は活性汚泥法の代表的な処理方法である。好気性微生物の代謝反応により、炭素成分は二酸化炭素と水、窒素成分はアンモニアや硝酸塩、硫黄成分は硫酸塩になる。処理対象排水としては、下水や有機性の工場排水が適している。標準的な好気処理法の模式図を Fig. 1-3 (A)に示す。

好気処理法は生分解可能な有機物類を処理できる比較的安価な方法である。しかし、曝気槽および沈殿池に多くの敷地面積を必要とする、流入負荷変動や環境変動により汚泥の沈降分離性が悪化する（バルキング）、余剰汚泥が発生するなどのデメリットも存在する。これらの問題を解決するため、種々の変法が提案されている。一例として、排水を分割して曝気槽の数カ所から導入するステップエアレーション法や環状の浅い曝気槽

を利用するオキシデーションディッチ法，沈殿槽の代わりに膜を用いて固液分離する膜分離活性汚泥法などが挙げられる．中でも膜分離活性汚泥法については近年急速に普及してきており，本研究のターゲットであるバイオフィウリングとも関連するため，改めて後述する．

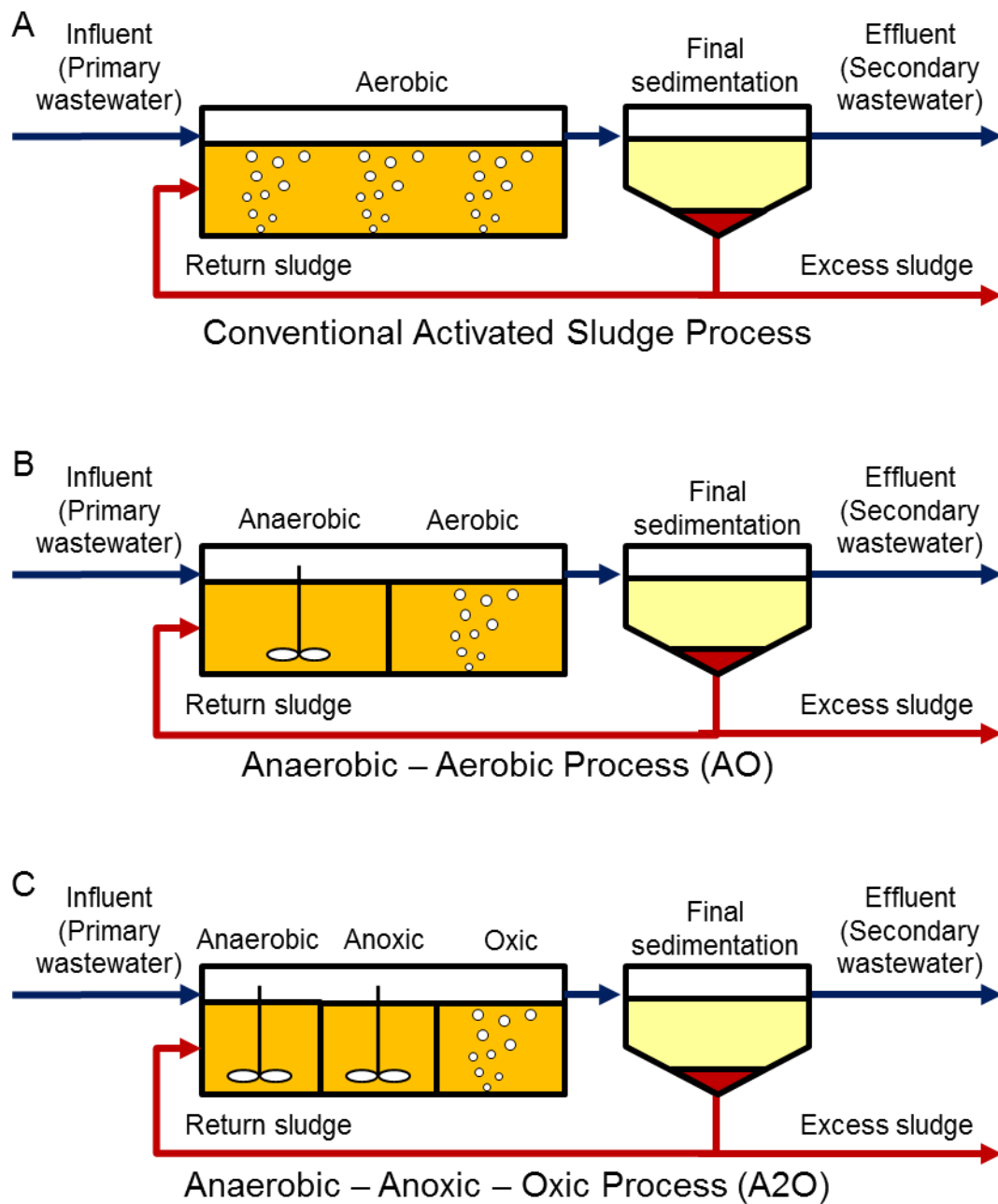
## ② 嫌気処理法

嫌気処理法はメタン発酵法に代表される処理方法である．嫌気性微生物の代謝反応により，有機物はアミノ酸，有機酸，アルコールなどを経て二酸化炭素，水素，硫化水素，アンモニア，メタンなどに変換される．産業排水やし尿および下水汚泥などに含まれる有機物類の処理に適する．好気処理法と比較して曝気（酸素供給）を必要としないため所要動力が少ない，発生するメタンガスをエネルギーとして利用できる，余剰汚泥の発生量が少ないなどの特徴がある．代表的な処理法として，粒状担体に付着した汚泥を用いる嫌気流動床(Anaerobic Fluid Bed, AFB)法や担体を用いずに自己造粒化したグラニューール汚泥を用いる上向流式嫌気汚泥床(Upflow Anaerobic Sludge Blanket, UASB)法がある．

## ③. 高度処理

1960年代後半より，活性汚泥法を用いたリン成分の除去に関する報告がなされるようになってきた．1967年にアメリカの San Antonio（テキサス州）の污水处理場におけるリン除去の現象が観測され<sup>[40]</sup>，以降，Baltimore（メリーランド州）<sup>[41]</sup>や Los Angeles（カリフォルニア州），Tucson（アリゾナ州）でも同様の現象が観測された．当初はその原理として諸説存在したが，現在ではポリリン酸蓄積細菌(Polyphosphate Accumulating Organisms, PAOs)によるリンの過剰接種現象が関与していることが知られている．基本的に PAOs は嫌気条件と好気条件を交互に実施することにより優占する．この考え方を元にした嫌気好気 (Anaerobic-aerobic, AO) 法により，汚水中のリンと有機物を同時に除去することができる．

上記の方法では窒素成分を十分に除去することができないため，これをさらに改良した嫌気無酸素好気(Anaerobic Anoxic Oxidation, A2O)法が開発された．AO 法および A2O 法の模式図をそれぞれ Fig. 1-3 (B)および Fig. 1-3 (C)に示す．



**Fig. 1-3** Diagram of conventional and advanced activated sludge process

#### 1.3.2.4. 活性汚泥法の課題

##### ① 余剰汚泥の発生

余剰汚泥の発生は、活性汚泥法における最大の課題といっても過言ではない。活性汚泥法では微生物が排水中の有機性汚濁物を餌として分解・除去するため、その結果として必ず微生物の増殖が生じる。環境省の調査によると、平成 23 年度の産業廃棄物の種類別排出量は汚泥が約 1 億 6,613 万トン（全体の 43.6%）で最も多くなっている<sup>[42]</sup>。そのうち再利用されているのは 6%に過ぎず、92%は減量化処理を実施している<sup>[42]</sup>。余剰汚泥の発生抑制はその後の処理費用削減や埋め立てに要する土地の低減にも繋がる重要な課題である。

##### ② バルキングによる放流障害

バルキングとは、活性汚泥フロックが何らかの理由で解体してしまい、沈降性を失った結果、活性汚泥処理後の沈降槽で活性汚泥が回収されず、系外へ流出してしまう現象を指す。

バルキングの発生原因としては複数の要因が挙げられる。汚水の組成変化（生物学的酸素要求量(Biological Oxygen Demand, BOD)や浮遊粒子(Suspended Solid, SS)、溶存酸素量(Dissolved Oxygen, DO))や流量変化、曝気槽内の曝気量、温度、pH 変化などがこれにあたる。余剰汚泥の引き抜き量・回数を適正に保つことも重要である。予防策としては、曝気槽の前段にクッション槽を設置して濃度・流量変動を抑えるなどして、曝気槽内における BOD 負荷等の項目を管理基準値内に抑えることが考えられる。また、曝気槽内の活性汚泥浮遊物(Mixed Liquor Suspended Solids, MLSS)、汚泥容量指標(Sludge Volume Index, SVI)等の測定により、汚泥の状態を日々管理することが望ましい。その他、日々の作業の中で汚泥の色合いや発泡具合、臭いの変化などをいち早く察知し対応するという、管理者の手腕や経験で対応できる要素も多い。バルキングが発生してしまった場合は、上記の管理項目の推移と現在の活性汚泥の状態から原因を見極め、適切な対応をする必要がある。

活性汚泥法が 100 年以上の歴史を有しながら未だにバルキングを主要な問題のひとつとして抱えている理由に、活性汚泥の構成細菌およびその機能・役割に関する情報がほとんどないことが挙げられる。前述のような数多の管理項目の変動によって具体的に何が起こり最終的な結果としてバルキングに至るのか、概略的な過程（嫌気性細菌が増えた、糸状菌が増えた、など）は分かっているけれども詳細なことはほとんど分かっていない。

そのため、今後、活性汚泥法をはじめとした生物学的水処理法を発展させていく上で、活性汚泥やその処理系内の構成細菌叢および各細菌の機能を把握することが重要であるといえる。

### 1.3.3. 膜分離法

#### 1.3.3.1. 緒言

膜分離法はこの四半世紀で急速に普及してきており、今後も重要なテクノロジーのひとつとして発展していくものと期待されている。こと水処理業界においては、膜分離法は汚水の高度処理法として、様々な汚水の浄化や濃縮に用いられている。膜分離法を活用することにより、工程数の削減や工程用水の再利用が期待できるほか、物質の選択的分離や操作の自動化、化学物質の添加が不要、省スペースなど、実に多くのメリットが得られる。また、分離に際して相変化を伴わないため、省エネルギーの分離方法である。例えば、海水淡水化においては蒸発法よりも膜分離法（逆浸透法、次節参照）がエネルギー的に有利である<sup>[43]</sup>。

#### 1.3.3.2. 膜の分類

膜は孔径や素材・モジュール形式等により分類することができる。一般的に膜の孔径は平均細孔径の大きい方から精密ろ過(Microfiltration, MF)膜、限外ろ過(Ultrafiltration, UF)膜、ナノろ過(Nanofiltration, NF)膜、逆浸透(Reverse Osmosis, RO)膜に分類される。孔径が小さくなるほど溶解性物質の阻止率が高いが、その分、送液のために高いポンプ圧力が必要であり、エネルギー消費が高くなる。膜素材は主に有機系の高分子膜と無機系のセラミック膜に大別される。有機高分子膜の例としてポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスルホン、ポリアクリロニトリルなどが挙げられる。無機セラミック膜の素材はアルミナが多く、MF膜やUF膜として用いられる。膜モジュール形式としては、平膜、管状膜、中空糸膜などが挙げられる<sup>[44]</sup>。ろ過方式としてはクロスフロー方式が多用される。これは膜に対して平行な水流を作ることで膜表面における剪断力を形成し、膜面への堆積物を防止することで、膜透過速度を確保するためであるが、乱流形成に十分な流量を供給できるポンプが必要となる<sup>[45]</sup>。

### 1.3.3.3. 膜分離法の課題

1990 年台前半までは、膜の製造コストをはじめオペレーションにかかるコストがネックとなって普及が進まなかった膜分離法も、21 世紀に入るところには大幅にコストが抑えられるようになった。主な理由として、装置設計の最適化による処理フラックスの向上、膜品質の向上による膜の長寿命化、および大規模施設の増加による膜製造コストの低下が挙げられる。結果として、上述の 10 年の間に膜製造コストは 10 分の 1 に、単位処理水量当たりのコストも 5 分の 1 にまで低減した<sup>[46]</sup>。

現在、膜分離法における最大の課題は、継続操業に伴う膜の目詰まりである。これにより膜透過フラックスが急激に減少し、処理性能が著しく低下する。目詰まりの因子としては、以下の 4 種類が挙げられる<sup>[47]</sup>。

- ① 有機性および無機性の粒子やコロイドによる物理的な孔閉塞
- ② 溶存性有機物の膜表面への吸着
- ③ 溶存性無機物の膜表面での沈殿
- ④ 微生物の膜表面への付着とそれによるバイオフィーム形成

このうち、生物学的水処理プロセスにおける膜分離で特に問題となるのが④のバイオフィーム形成である。バイオフィームについては、その対策技術や評価法を含めて第 3 章に記す。

### 1.3.4. 活性汚泥法と膜分離法

#### 1.3.4.1. 膜分離活性汚泥法

近年、従来の活性汚泥法における沈殿槽の代わりに膜による固液分離を行う膜分離活性汚泥法(Membrane Bioreactor, MBR)が実用化されてきている。膜分離を用いることにより、それまで必要だった固液分離のための運転管理上の制約が緩和され、汚泥を比較的高濃度で保持することができるようになった。また、処理水質がよいため、砂ろ過等が不要になった。これらの利点は、省スペースにもつながっている。

膜分離活性汚泥法は、小規模施設を中心に導入・実用化が進められてきた。わが国では、平成 17 年 3 月に兵庫県福崎町福崎浄化センターが初めて MBR による供用を開始し、平成 23 年 3 月には大規模施設 (60,000 m<sup>3</sup>/d) である大阪府堺市三宝下水処理場で供用が開始された。これはわが国初の大規模施設における改築となっている。

通常、MBR では MF 膜や UF 膜が用いられるため、その処理水質は良好である。SS や

大腸菌などの微生物も除去することができるため、河川などへ放流する際には消毒の必要がない。近年ではこの処理水に対し RO 膜を適用することで、処理水の再利用を検討する例も増えている。

#### 1.3.4.2. 三次処理としての膜分離

排水処理系の新規建設案件に関しては、特に小規模施設においては膜分離活性汚泥法が主流になりつつあるが、既に標準活性汚泥法等を運転中の施設で処理水質を上げたい場合には、活性汚泥法による処理後の三次処理として膜分離法を適用する。これにより、現行の処理を生かしつつ、イニシャルコストを抑えられる。

#### 1.3.5. まとめ

1.3.2.節および 1.3.3.節において、活性汚泥法および膜分離法についてのそれぞれの課題を示した。各節における課題を簡単にまとめると、余剰汚泥の発生やバルキング現象、バイオフィウリングなどが挙げられるが、いずれも活性汚泥を構成する各細菌の機能を少しずつ明らかにしていくことで各管理工程の改善に繋がる可能性がある。次節ではこれらの課題の中でも特に QS に関連・影響する部分について記述する。

### 1.4. 生物学的な水処理と QS

#### 1.4.1. 概要

膜分離工程を含め、活性汚泥法では系内に菌体密度が高くなる工程がいくつか存在する。QS は一定の菌体密度により様々な遺伝子機能が発現するため、それら菌体密度が高い箇所では QS が活性や構造に影響を与えていると考えられる。そのような場として、まず活性汚泥そのものが挙げられる。活性汚泥は微生物の凝集体であるため、フロック内部の菌体密度は高いと考えられる。また、分離膜表面において発生するバイオフィームも菌体密度が高いといえる。バイオフィームのライフサイクルについては第 3 章で述べるが、バイオフィーム形成過程ではマイクロコロニーの形成やそれらの集合体がかかわってくる。これらの環境下では、QS 制御が活発に行われていると予想される。

次節では、活性汚泥中の QS を調査した既往の研究を紹介する。なお、バイオフィームと QS の関係については、これがバイオフィーム対策技術のひとつと認識されつつあることから、第 3 章においてバイオフィーム及びその物理化学的な対策技術と併せて紹介する。

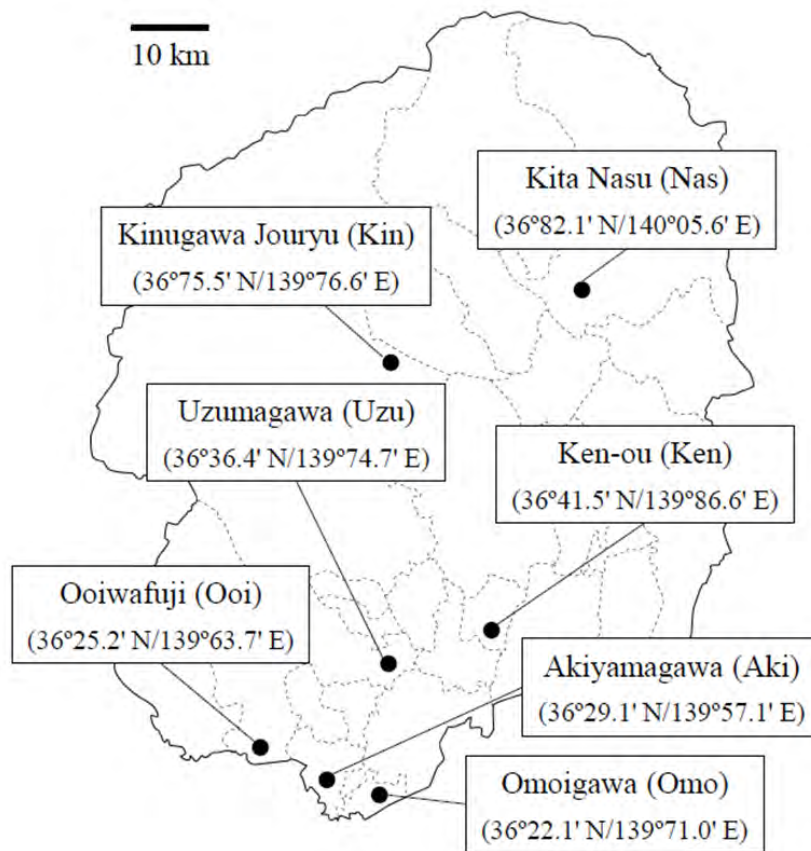
#### 1.4.2. 活性汚泥と QS

活性汚泥と QS の関係については、いくつか研究例がある。活性汚泥に AHL を添加することで、微生物の群集構造やフェノール分解の継続性に変化が観察されたことを報告するもの<sup>[48]</sup>や、キチナーゼ活性が向上したことを報告するもの<sup>[49]</sup>がある。また、構造面では活性汚泥のグラニュール粒径と単位バイオマス当たりの AHL 量に正の相関関係があり、EPS 生産量も増加することから、グラニュール形成に対して QS 制御の影響が示唆される<sup>[50]</sup>。

#### 1.4.3. 既往の研究

本研究グループでは、Fig. 1-4 に示す栃木県内 7 ヶ所の浄化センターの活性汚泥から細菌を単離し、QS に関与する細菌として AHL 合成細菌と AHL 分解細菌のスクリーニングを実施した。スクリーニングした菌について、PCR により 16S rRNA 遺伝子を増幅して塩基配列を決定し、国際塩基配列データベースを用いて細菌種を同定した。AHL 合成細菌および AHL 分解細菌の同定結果を、それぞれ Table 1-1 および Table 1-2 に示す。AHL 合成細菌として単離された菌の 95%は *Aeromonas* 属細菌であり、AHL 分解細菌として単離された菌のうち、多くは *Acinetobacter* 属細菌であった。これらの菌種が活性汚泥およびその系内に生息していることは過去の研究<sup>[51]</sup>により示されているが、QS に関与する細菌に限定してもこれらの細菌が活躍していることを示す結果となった。





**Fig. 1-4 Location of seven sewage treatment centers in Tochigi Prefecture, Japan**

**Table 1-1 AHL producing bacteria isolated from activated sludge**

Closest genus	Sites							percentage
	Aki	Ken	Kin	Nas	Omo	Ooi	Uzu	
<i>Aeromonas</i>	15	15	3	9	12	19	29	95.3%
<i>Pseudomonas</i>			1					0.9%
<i>Citrobacter</i>						2		1.9%
<i>Enterobacter</i>	2							1.9%
Total	17	15	4	9	12	21	29	100.0%

**Table 1-2 AHL-degrading bacteria isolated from activated sludge**

Closest genus	Sites							percentage
	Aki	Ken	Kin	Nas	Omo	Ooi	Uzu	
<i>Acinetobacter</i>	1	3	1	7	2	4	3	45.7%
<i>Pseudomonas</i>		3				3		13.0%
<i>Klebsiella</i>	5	1		2		1		19.6%
<i>Comamonas</i>			1			1		4.3%
<i>Stenotrophomonas</i>						1		2.2%
<i>Staphylococcus</i>	1		1					4.3%
<i>Bacillus</i>		2						4.3%
<i>Chryseobacterium</i>	1			1	1			6.5%
Total	8	9	3	10	3	10	3	100.0%

## 1.5. 研究の目的

以上より，本研究では，活性汚泥構成細菌の中でもグラム陰性細菌の QS 制御に関わる AHL 合成細菌および AHL 分解細菌に着目し，これらの細菌の QS 制御機構の把握および QS 制御による機能変化の解析を行った．第 3 章では AHL 合成細菌として *Aeromonas* 属細菌に着目し，この細菌が工場排水にも多数存在していることから排水処理における膜ファウリングとの関係を解析した．また，第 4 章では AHL 分解細菌として *Acinetobacter* 属細菌に着目し，この細菌に AHL 分解細菌としての報告が少ないことから AHL 分解機構の解析を行った．これらの結果より，活性汚泥法における QS 制御による処理活性の向上や管理手法の改善の可能性について考察した．

## References

- [1] Matthew R. Parsek, E. Peter Greenberg (2000) Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *PNAS* **97**: 8789-8793.
- [2] Kenneth H. Nealson, Terry Platt, and J. Woodland Hastings (1970) Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System. *J. Bacteriol.* **104**: 313-322.
- [3] E. Peter Greenberg (1997) Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria. *ASM News*, **63**: 371-377.
- [4] E. P. Greenberg, J. W. Hastings, and S. Ulitzur (1979) Induction of Luciferase Synthesis in *Beneckea harveyi* by Other Marine Bacteria. *Arch. Microbiol.* **120**: 87-91.
- [5] A. Eberhard, A. L. Burlingame, C. Eberhard, G. L. Kenyon, K. H. Nealson, and N. J. Oppenheimer (1981) Structural Identification of Autoinducer of *Photobacterium fischeri* Luciferase. *Biochem.* **20**: 2444-2449.
- [6] Joanne Engebrecht and Michael Silverman (1984) Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 4154-4158.
- [7] Joanne Engebrecht, Kenneth Nealson, and Michael Silverman (1983) Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell*, **32**: 773-781.
- [8] Heidi B. Kaplan and E. P. Greenberg (1985) Diffusion of Autoinducer Is Involved in Regulation of the *Vibrio fischeri* Luminescence System. *J. Bacteriol.* **163**: 1210-1214.
- [9] Paul V. Dunlap and E. P. Greenberg (1988) Control of *Vibrio fischeri lux* Gene Transcription by a Cyclic AMP Receptor Protein-LuxR Protein Regulatory Circuit. *J. Bacteriol.* **170**: 4040-4046.
- [10] Margo G. Haywood and Kenneth H. Nealson (1985) Mechanisms of Iron Regulation of Luminescence in *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* **162**: 209-216.
- [11] Michael J. Gambello and Barbara H. Iglewski (1991) Cloning and Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* Gene, a Transcriptional Activator of Elastase Expression. *J. Bacteriol.* **173**: 3000-3009.
- [12] Kevin R. Piper, Susanne Beck von Bodman, and Stephen K. Farrand (1993) Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature*, **362**: 448-450.

- [13] James P. Pearson, Luciano Passador, Barbara H. Iglewski, and E. P. Greenberg (1995) A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 1490-1494.
- [14] W. Claiborne Fuqua, Stephen C. Winans, and E. Peter Greenberg (1994) Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *J. Bacteriol.* **176**: 269-275.
- [15] Matthew R. Parsek and E. P. Greenberg (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *TRENDS Microbiol.* **13**: 27-33.
- [16] Joshua D. Shrouf, Robert Nerenberg (2012) Monitoring Bacterial Twitter: Does Quorum Sensing Determine the Behavior of Water and Wastewater Treatment Biofilms?. *Environ. Sci. Technol.* **46**: 1995-2005.
- [17] Kishore Kamaraju, Jacqueline Smith, Jingxin Wang, Varnika Roy, Herman O. Sintim, William E. Bentley, and Sergei Sukharev (2011) Effects on Membrane Lateral Pressure Suggest Permeation Mechanisms for Bacterial Quorum Signaling Molecules. *Biochem.* **50**: 6983-6993.
- [18] Orla M. Cloak, Barbara T. Solow, Connie E. Briggs, Chin-Yi Chen, and Pina M. Fratamico (2002) Quorum Sensing and Production of Autoinducer-2 in *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 4666-4671.
- [19] Jintae Lee, Tarun Bansal, Arul Jayaraman, William E. Bentley, and Thomas K. Wood (2007) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Biofilms Are Inhibited by 7-Hydroxyindole and Stimulated by Isatin. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 4100-4109.
- [20] Daniel López, Michael A. Fischbach, Frances Chu, Richard Losick, and Roberto Kolter (2009) Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *PNAS*, **106**: 280-285.
- [21] Zhihui Xu, Jiahui Shao, Bing Li, Xin Yan, Qirong Shen, and Ruifu Zhang (2013) Contribution of Bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to Antifungal Activity and Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 808-815.
- [22] Ya-Wen He and Lian-Hui Zhang (2008) Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol.* **32**: 842-857.
- [23] Fei Tao, Sanjay Swarup, and Lian-Hui Zhang (2010) Quorum sensing modulation of a putative glycosyltransferase gene cluster essential for *Xanthomonas campestris* biofilm formation. *Environ. Microbiol.* **12**: 3159-3170.

- [24] Liang Yang, Martin Nilsson, Morten Gjermansen, Michael Givskov, and Tim Tolker-Nielsen (2009) Pyoverdine and PQS mediated subpopulation interactions involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **74**: 1380-1392.
- [25] Mair E. A. Churchill, Lingling Chen (2011) Structural Basis of Acyl-homoserine Lactone-Dependent Signaling. *Chem. Rev.* **111**: 68-85.
- [26] Benjamin Michael Davis, Rasmus Jensen, Paul Williams, and Paul O'Shea (2010) The Interaction of *N*-Acylhomoserine Lactone Quorum Sensing Signaling Molecules with Biological Membranes: Implications for Inter-Kingdom Signaling. *PLoS ONE*, **5**: e13522.
- [27] Karen L. Visick and Margaret J. McFall-Ngai (2000) An Exclusive Contract: Specificity in the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* Partnership. *J. Bacteriol.* **182**: 1779-1787.
- [28] Stuart B. Levy (1998) The Challenge of Antibiotic Resistance. *Scientific American, Inc.* :47-53.
- [29] Tsukasa Ikeda, Yuki Inoue, Akihito Suehiro, Hirofumi Ikeshoji, Takenori Ishida, Noboru Takiguchi, Akio Kuroda, Junichi Kato, and Hisao Ohtake (2002) The Effects of Cyclodextrins on Autoinducer Activities of Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Incl. Phenom. Macro.* **44**: 381-382.
- [30] Tomohiro Morohoshi, Kazuho Tokita, Satoshi Ito, Yuki Saito, Saki Maeda, Norihiro Kato, and Tsukasa Ikeda (2013) Inhibition of quorum sensing in gram-negative bacteria by alkylamine-modified cyclodextrins. *J. Biosci. Bioeng.* **116**: 175-179.
- [31] Chigusa Okano, Marina Arai, Eri Nasuno, Ken-ichi Iimura, Tomohiro Morohoshi, Tsukasa Ikeda, and Norihiro Kato (2012)  $\beta$ -Cyclodextrin Interaction with *N*-Hexanoyl Homoserine Lactone as Quorum Sensing Signal Produced in Gram-Negative Bacteria. *Trans. Mat. Res. Soc. Japan*, **37**: 315-318.
- [32] Norihiro Kato, Tomohiro Morohoshi, Tomoya Nozawa, Hitomi Matsumoto, and Tsukasa Ikeda (2006) Control of Gram-Negative Bacterial Quorum Sensing with Cyclodextrin Immobilized Cellulose Ether Gel. *J. Incl. Phenom. Macro.* **56**: 55-59.
- [33] Norihiro Kato, Toru Tanaka, Shota Nakagawa, Tomohiro Morohoshi, Kazuhisa Hiratani, and Tsukasa Ikeda (2007) Control of virulence factor expression in opportunistic pathogens using cyclodextrin immobilized gel. *J. Incl. Phenom. Macro.* **57**: 419-423.
- [34] Max Teplitski, Jayne B. Robinson, and Wolfgang D. Bauer (2000) Plants Secrete

- Substances That Mimic Bacterial *N*-Acyl Homoserine Lactone Signal Activities and Affect Population Density-Dependent Behaviors in Associated Bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 637-648.
- [35] Puneet K. Chowdhary, Neela Keshavan, Hien Q. Nguyen, Julian A. Peterson, Juan E. González, and Donovan C. Haines (2007) *Bacillus megaterium* CYP102A1 Oxidation of Acyl Homoserine Lactones and Acyl Homoserines. *Biochem.* **46**: 14429-14437.
- [36] Stéphane Uroz, Siri Ram Chhabra, Miguel Cámara, Paul Williams, Phil Oger, and Yves Dessaux (2005) *N*-Acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. *Microbiol.* **151**: 3313-3322.
- [37] USEPA () 米国環境保護庁ホームページ. <http://www.epa.gov/>.
- [38] F. Jorand, F. Zartarian, F. Thomas, J. C. Block, J. Y. Bottero, G. Villemin, V. Urbain, and J. Manem (1995) Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Water Res.* **29**: 1639-1647.
- [39] C. A. Biggs and P. A. Lant (2000) Activated sludge flocculation: on-line determination of floc size and the effect of shear. *Water Res.* **34**: 2542-2550.
- [40] William F. Milbury, Donald McCauley, and Charles H. Hawthorne (1971) Operation of Conventional Activated Sludge for Maximum Phosphorus Removal. *Water Poll. Cont. Fed.* **43**: 1890-1901.
- [41] S. B. Surman, J. T. Walker, D. T. Goddard, L. H. G. Morton, C. W. Keevil, W. Weaver, A. Skinner, K. Hanson, D. Caldwell, and J. Kurtz (1996) Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. *J. Microbiol. Meth.* **25**: 57-70.
- [42] 環境省 (H23) 産業廃棄物の排出及び処理状況等について. <http://www.env.go.jp/recycle/waste/sangyo.html>.
- [43] Bart Van der Bruggen and Carlo Vandecasteele (2002) Distillation vs. membrane filtration: overview of process evolutions in seawater desalination. *Desalination*, **143**: 207-218.
- [44] 吉田 隆 (2000) 新しい水処理シリーズ2 膜を利用した新しい水処理. 日経印刷株式会社 .:
- [45] Graham Pearce (2007) Water and wastewater filtration: Membrane module format. *Filtr. Separat.* :31-33.
- [46] Steve Churchouse and Duncan Wildgoose (1999) Membrane bioreactors progress from the laboratory to full-scale use. *Membrane Technol.* **111**: 4-8.
- [47] Wenshan Guo, Huu-Hao Ngo, and Jianxin Li (2012) A mini-review on membrane

- fouling. *Bioresource Technol.* **122**: 27-34.
- [48] Anna Valle, Mark J. Bailey, Andrew S. Whiteley, Mike Manefield (2004) *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) affect microbial community composition and function in activated sludge. *Environ. Microbiol.* **6**: 424-433.
- [49] Grace Chong, Onder Kimyon, Scott A. Rice, Staffan Kjelleberg, Mike Manefield (2012) The presence and role of bacterial quorum sensing in activated sludge. *Microb. Biotech.* **5**: 621-633.
- [50] Yao-Chen Li and Jian-Rong Zhu (2014) Role of *N*-acyl homoserine lactone (AHL)-based quorum sensing (QS) in aerobic sludge granulation. *Appl. Microbiol. Biotech.* **98**: 7623-7632.
- [51] P. Kämpfer, R. Erhart, C. Beimfohr, J. Böhringer, M. Wagner, and R. Amann (1996) Characterization of Bacterial Communities from Activated Sludge: Culture-Dependent Numerical Identification Versus In Situ Identification Using Group- and Genus-Specific rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. *Microb. Ecol.* **32**: 101-121.



## 第2章 使用菌株・プラスミド・試薬および機器

### 2.1. 使用菌株・プラスミド

本研究に用いた菌株およびプラスミドを Table 2-1 に示す。

**Table 2-1 Bacterial strains and plasmids used in this study**

Strain or plasmid	Description	Source
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	F- supE44 DlacU169 (j80 lacZDM15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Nippon Gene
S17-1 $\lambda$ pir	<i>thi pro hsdR hsdM<sup>r</sup> recA RP4 2TC :: Mu-Km :: Tn7</i>	Simon et al. <sup>[1]</sup>
<i>Chromobacterium violaceum</i>		
CV026	ATCC 31532 derivative, <i>cviI :: Tn5xyIE Km<sup>r</sup>, Sm<sup>r</sup></i>	McClellan et al. <sup>[2]</sup>
VIR07	ATCC 12472 derivative, <i>cviI :: Km<sup>r</sup>, Ap<sup>r</sup></i>	Morohoshi et al. <sup>[3]</sup>
<i>Aeromonas hydrophila</i>		
R2	AHL producer isolated from industrial AS process	This study
<i>Acinetobacter</i> sp.		
Ooi24	AHL-degrading strain isolated from AS	This study
<i>Bacillus cereus</i>		
	ATCC 14579	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	Wild-type strain	Holloway et al. <sup>[4]</sup>
Plasmids		
pJP5603	Suicide vector, Km <sup>r</sup>	Penfold et al. <sup>[5]</sup>
pUC118	Cloning vector, Ap <sup>r</sup>	Takara Bio
pAO24-1	5,356-bp <i>Sau3AI</i> fragment from Ooi24 genomic DNA in pUC118	This study
pGEM-T easy	Cloning vector, Ap <sup>r</sup>	Promega
pGEM-amiE	pGEM-T easy containing <i>amiE</i> from Ooi24	This study
pLas28	pSTV28 vector containing <i>lasI</i> and <i>lasR</i> from PAO1; Cm <sup>r</sup>	
pBBR1MCS5	Broad host range cloning vector; Gm <sup>r</sup>	Kovach et al. <sup>[6]</sup>
pBBR1-ahIS	pBBR1MCS5 containing <i>ahIS</i> from <i>Solibacillus silvestris</i> StLB046	Morohoshi et al. <sup>[7]</sup>
pBBR1-amiE	pBBR1MCS5 containing <i>amiE</i> from Ooi24	This study

## 2.2. 試薬類

本研究に用いた試薬類を Table 2-2 に示す.

**Table 2-2 Chemical reagents used in this study**

Reagent	Usage	Manufacturer
BACTERIOLOGICAL PEPTONE	LB medium	Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd.
YEAST EXTRACT	LB medium	Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd.
Sodium chloride	LB medium	Kanto Chemical Co., Inc.
Agar powder	LB medium	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
R2A Broth	R2A medium	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
Agarose LE	Electrophoresis	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
Tris Acetate EDTA	Electrophoresis	Nippon Gene Co., Ltd.
Mag Extractor	DNA extraction	TOYOBO Co., Ltd.
C4-HSL	AHL standard for TLC, etc.	Synthesized in our Lab.
C6-HSL	AHL standard for TLC, etc.	Synthesized in our Lab.
C7-HSL	AHL standard for TLC	Synthesized in our Lab.
C8-HSL	AHL standard for TLC, etc.	Synthesized in our Lab.
C10-HSL	AHL degrading experiment	Synthesized in our Lab.
C12-HSL	AHL degrading experiment	Synthesized in our Lab.
3OC6-HSL	AHL degrading experiment	Synthesized in our Lab.
3OC8-HSL	AHL degrading experiment	Synthesized in our Lab.
3OC10-HSL	AHL degrading experiment	Synthesized in our Lab.
3OC12-HSL	AHL degrading experiment	Synthesized in our Lab.
Acetonitrile	HPLC	Kanto Chemical Co., Inc.
Dimethylsulfoxide	AHL solvent	Kanto Chemical Co., Inc.
Ethanol	Washing, etc.	Kanto Chemical Co., Inc.
2-Propanol	Chromosome extraction	Kanto Chemical Co., Inc.
Ethyl Acetate	AHL extraction	Kanto Chemical Co., Inc.
Methanol	AHL extraction	Kanto Chemical Co., Inc.
1 N HCl	AHL restoration	Kanto Chemical Co., Inc.
Crystal Violet	Biofilm staining	Kanto Chemical Co., Inc.
FilmTracer™ LIVE/DEAD Biofilm Viability Kit	Biofilm staining	Molecular Probes, Inc.
2xLigation Mix	DNA ligation	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
Proteinase K	Chromosome extraction	Kanto Chemical Co., Inc.

Reagent	Usage	Manufacturer
GoTaq Green Master Mix	PCR	Promega
BigDye Terminator ver 3.1	PCR	Applied Biosystems
Blend Taq -Plus-	PCR	TOYOBO Co., Ltd.
Nucleospin Gel and PCR Clean-up	DNA purification	Takara Bio Inc.

### 2.3. 使用機器

本研究に用いた機器類を Table 2-3 に示す.

**Table 2-3 Devices used in this study**

Device	Model number	Manufacturer
Shaking incubator	EYELA FMC-1000,	Tokyo Rikakikai Co., Ltd.
	EYELA MULTI SHAKER MMS	Tokyo Rikakikai Co., Ltd.
	M・BR-022UP	TAITEC Co., Ltd.
Centrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf AG.
	KINTARO-24	TOMY Seiko Co., Ltd.
Cooled centrifuge	MX-300	TOMY Seiko Co., Ltd.
Autoclave	SX-700	TOMY Seiko Co., Ltd.
	LSX-300	TOMY Seiko Co., Ltd.
Clean bench	NK System MB-850	NK System
	MCV-711ATS	SANYO Electric Co., Ltd.
Thermal cycler	PC802	ASTEC Co., Ltd.
	GeneAtlas G02	ASTEC Co., Ltd.
Sequencer	BigDye Terminator ver. 3.1 and	Applied Biosystems
	ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	
Vortex mixer	VORTEX-GENIE 2 Mixer	M&S Instruments Inc.
Block incubator	BI-525A	ASTEC Co., Ltd.
	EYELA MG-1200	Tokyo Rikakikai Co., Ltd.
Microplate spectrophotometer	SpectraMaxPlus-UK	Molecular Devices Co.
Electrophoresis	Mupid-2X	Takara Bio Inc.
	WSE1710 Submerge-Mini	ATTO Corporation
Electroporator	MicroPulser	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Confocal Laser Scanning Microscope	IX81 (inverted microscope)	Olympus Corporation

## References

- [1] R. Simon, U. Prierer, and A. Pühler (1983) A Broad Host Range Mobilization System for *In Vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat. Biotechnol.* **1**: 784-791.
- [2] Kay H. McClean, Michael K. Winson, Leigh Fish, Adrian Taylor, Siri Ram Chhabra, Miguel Camara, Mavis Daykin, John H. Lamb, Simon Swift, Barrie W. Bycroft, Gordon S. A. B. Stewart, and Paul Williams (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiol.* **143**: 3703-3711.
- [3] Tomohiro Morohoshi, Masashi Kato, Katsumasa Fukamachi, Norihiro Kato, and Tsukasa Ikeda (2008) *N*-Acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiol. Lett.* **279**: 124-130.
- [4] B. W. Holloway, V. Krishnapillai, and A. F. Morgan (1979) Chromosomal Genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol. Rev.* **43**: 73-102.
- [5] Robert J. Penfold and John M. Pemberton (1992) An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutations in bacteria. *Gene*, **118**: 145-146.
- [6] Michael E. Kovach, Phillip H. Elzer, D. Steven Hill, Gregory T. Robertson, Michael A. Farris, R. Martin Roop II, and Kenneth M. Peterson (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, **166**: 175-176.
- [7] Tomohiro Morohoshi, Yoshiaki Tominaga, Nobutaka Someya, and Tsukasa Ikeda (2012) Complete genome sequence and characterization of the *N*-acylhomoserine lactone-degrading gene of the potato leaf-associated *Solibacillus silvestris*. *J. Biosci. Bioeng.* **113**: 20-25.

## 第3章 アシル化ホモセリンラクトン合成細菌の解析

### 3.1. 緒言

#### 3.1.1. AHL 合成細菌とバイオフィーム

生分解性の物質であれば活性汚泥法で処理が可能である。しかしながら、標準活性汚泥法は汚泥負荷等の観点から、難分解性物質や毒性物質の多い工場廃水については安定した処理が望めない、もしくは処理後の水質基準を達成できないケースが多く、適用が難しいという問題を抱えていた。

近年の膜分離活性汚泥法による BOD 容積負荷の向上や、汚泥のグラニュール化による毒性物質への対応力の向上により、種々の工場廃水への活性汚泥法変法の適応が検討されるようになってきた。しかし、膜分離を用いる場合にはファウリングの問題が付きまとい、その対策が必要となってくる。活性汚泥法は生物処理法であるため、ファウリングの主な原因は膜上に微生物がバイオフィームを形成することに起因するバイオフィアウリングである。

#### 3.1.2. バイオフィームについて

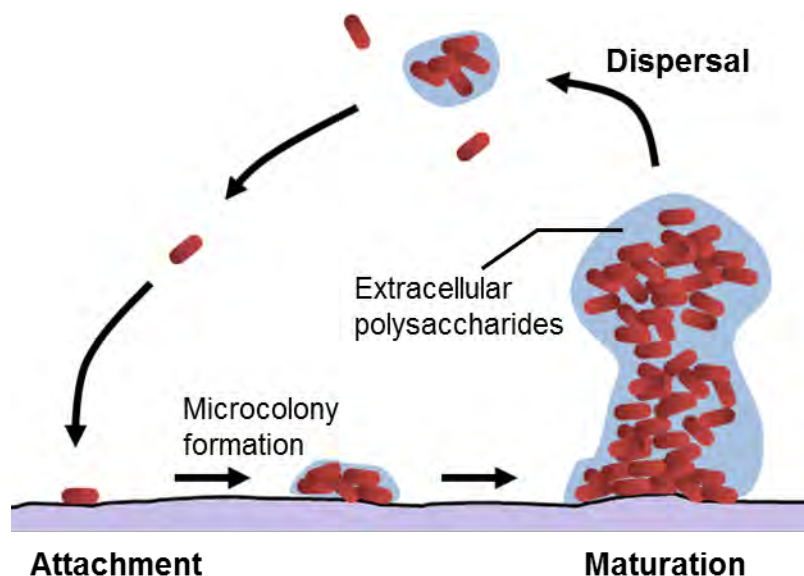
##### 3.1.2.1. バイオフィームとは

バイオフィームは、何らかの物質表面に付着した微生物の集団と、その微生物により生産される細胞外多糖(Extracellular polysaccharide, EPS)などのマトリックスによって構成される3次元構造を持った複合体である<sup>[1]</sup>。バイオフィームは河川や風呂場、流し、配管、医療器具、歯など、水が関わるあらゆる環境の表面に発生する。河川やビオトープ等に発生したバイオフィームは水質の浄化に寄与する一面もあるが、その他の多くの場面において、バイオフィームは表面の腐食等で環境に悪影響を与える原因となっている。とはいえ、いずれの場合も微生物にとっては生存に適した環境を構築するためにバイオフィームを形成しているといえる。微生物においては、バイオフィームの形成によって、水分の保持による乾燥への耐性、宿主免疫系に対する抵抗性、毒性物質への抵抗性などが上昇する。

##### 3.1.2.2. バイオフィームのライフサイクル

バイオフィームはいくつかの段階を経て形成（解体）されることが知られている。主

に①浮遊状態の菌体の物質表面への付着過程(Attachment), ②増殖を伴いながら3次元構造を形成する成熟過程(Maturation), そして③成熟したバイオフィームから再び浮遊状態へ移行する脱離過程(Dispersal)が挙げられる。バイオフィームから脱離した菌体は、また新たな環境を見つけて付着する。上記一連のライフサイクルを図式化したものを Fig. 3-1 に示す。



**Fig. 3-1 Life cycle of biofilm formation**

Once bacterium attaches to the surface, it grows proliferously on the surface, forming microcolonies and eventually 3-dimensional structures. Dispersion occurs at certain condition such as in the lack of oxygen and other nutrition, or when particular signal metabolites are accumulated.

### 3.1.3. バイオフィーム対策技術

バイオフィームは様々な環境で発生する。したがって、その対策技術も様々な分野で様々な手法が検討されてきた。本節では生物学的手法に限らず、広くバイオフィーム形成の対策として研究されてきた技術・方法について紹介する。

#### 3.1.3.1. 物質の添加もしくは制限

##### ① バイオサイドの利用

バイオサイド(biocide)とは、微生物汚染を防ぐための薬剤のことである。浄水場で添加

される塩素は、古くから用いられている代表的なバイオサイドであり、流入水に連続的に添加する必要がある。バイオフィーム制御効率には添加するバイオサイドの種類のほか、系の生物活性、接触時間、流入水 pH、有機物・無機物濃度などが影響する<sup>[2]</sup>。

塩素は殺菌剤として広く利用されているが、膜にダメージを与えてしまうこと<sup>[3]</sup>と同化性有機炭素が大量に発生して微生物成長を促す<sup>[4]</sup>観点から、バイオフィウリングの予防法としては利用が難しい。代替物質としては二酸化塩素が有用であるが、製造コストやハンドリングの問題などが欠点である<sup>[3]</sup>。クロラミンも代替物質として挙げられるが、塩素と比較して反応性が低いほか、トリハロメタンなどの副生成物が発生してしまうという問題を抱える<sup>[5]</sup>。

微生物やウイルスの不活性化にはオゾンも有効である。しかしオゾン自体は不安定な物質なのでオンサイトで生成される必要がある。また塩素系殺菌剤の場合と同様に、発ガン性・変異原性物質<sup>[6]</sup>や同化性有機炭素<sup>[7]</sup>の副次的な発生が問題となる。

その他、バイオサイドとしてはヨウ素、過酸化水素、過酢酸が挙げられる。これらは酸化力が強く、配管や連結管などの消毒剤としては効果的である<sup>[3]</sup>が、膜へのダメージが大きいことから膜関連の消毒剤としてはあまり用いられていない。亜硫酸水素ナトリウムは酸素と結合することで酸素濃度を下げ、好気性微生物には効果を発揮するものの、その効果は細菌種に依存する<sup>[5]</sup>。さらに、硫酸還元菌など一部の細菌は亜硫酸ナトリウムへ耐性を示す<sup>[8]</sup>。

非酸化性のバイオサイドとして、ホルムアルデヒドやグルタルアルデヒド、四級アンモニウムなどがあるが、これらは長期的に用いることで細菌の耐性化を促す可能性がある<sup>[8]</sup>。

総じてバイオサイドの欠点として、凝集体（クラスター）を形成するような微生物には内部まで効果が現れにくいという点が挙げられる。また、物質によっては使用を続けることで耐性を獲得する可能性がある。さらに、バイオサイドの使用は、地球環境全体という視点からは負荷がかかる手法であり、オンサイトにおける処理効果だけでなく薬剤耐性化の問題や外環境へ流出後の影響も含めてトータルに議論されるべきである。

## ② 栄養制限

バイオフィウリングを防止するためには、細菌増殖の元となる栄養を制限すればよい。このためには主に同化性有機炭素の制限とリン系化合物の制限<sup>[9]</sup>が効果的である。同化性有機炭素の場合は前工程で活性炭吸着・生物学的ろ過<sup>[10]</sup>・緩速砂ろ過<sup>[11]</sup>・膜ろ過の利用

によって、リン系化合物の場合は薬品沈殿や結晶化、吸着剤の利用など<sup>[12]</sup>によって、その後の膜処理における負担が抑えられる。ただ、これらの栄養制限は、本質的に同じ栄養（同化性有機炭素とリン）を与えることで処理を進める活性汚泥法との併用は困難であると思われる。バイオフィウリング防止のために活性汚泥法と膜分離の間に活性炭処理を導入するのは、バイオフィウリングを抑制する代わりに管理工程をひとつ増やすだけで非現実的であると思われる。また、リン系化合物の凝集沈殿についても、本来流入水のリン濃度が高い場合に活性汚泥法の前処理として導入するものであるため、二度手間になってしまう。

### ③ 凝集剤の使用

凝集剤を添加することで水中の微粒子の共凝集を促し、サイズや形状・電荷を変化させることでファウリングを抑制することができる。これに伴い、生分解可能な有機物も巻き込んで凝集させ、その濃度を減少させる効果も持つため、バイオフィウリングの抑制にも効果がある方法である<sup>[13]</sup>。一方で、凝集処理後の水質がかえって悪影響を及ぼす例も報告されている（ただし、これはバイオフィウリングが原因ではなく、凝集剤として用いた硫酸アルミニウムや塩化鉄(III)などが影響している)<sup>[14]</sup>。凝集剤による処理が効果的か否かは、流入水の水質、膜の種類・構造、膜洗浄頻度などによって変わってくると考えられる。

### ④ 銀ナノ粒子の利用

銀ナノ粒子は様々な微生物の増殖や活動を制御できる効果的な材料である<sup>[15]</sup>。しかし、水中の固体表面に発生するバイオフィルムの形成抑制には効果を発揮するが、既に成熟したバイオフィルムの除去や殺菌消毒には向かない<sup>[16]</sup>。費用対効果も低く、膜分離を用いた水処理分野では適用例は少ない。

#### 3.1.3.2. 動電学的手法

精密ろ過膜や限外ろ過膜へ電界を加えることでファウリングが抑えられるという報告がある<sup>[17]</sup>。膜に平行に電極を配置して電流を流すと、垂直方向に電界が発生する。生物懸濁液中の粒子は負電荷を有するものがほとんどであり、電気泳動の効果で膜から引き剥がすことができる。その効果は、直流電場よりも交流電場の方が高いとされている。交流の電場が孔内の微粒子の振動を促し、付着を妨げファウリングが抑制されるためである。これを MBR に適用した研究も行われており、断続的に電圧を印加することでバイ



オフアウリングが効果的に抑制できることが報告されている<sup>[18]</sup>。実用化には、耐腐食性に優れ、かつ安価な電極の開発が求められる。また、膜自体に導電性が備わった新規膜の開発も、電界によるファウリング抑制技術が躍進するかどうかの鍵となる。

### 3.1.3.3. 膜改質・膜洗浄

#### ① 膜改質

膜の表面改質はバイオフィアウリング抑制法として古くから研究されてきた。細菌への親和性が低い材質や容易に洗浄可能な材質を用いる方法、また、静菌特性を持つ材質を表面に修飾することで微生物の増殖を抑える方法がある。具体的には、ポリマーブレンド法、グラフト重合法、表面コーティング、無機物や抗菌剤の添加が挙げられる。このうち、ポリマーブレンド法はポリマーの混和性や修飾後の表面安定性に課題が残る。グラフト重合法は膜透過率や孔径などの物理化学的性質が変わってしまい、当初狙っていた処理水質が得られないことがある。表面コーティングは長期の機械的・化学的安定性に欠けるほか、膜洗浄の際にコーティング剤が剥がれてしまうことがある。付着阻害活性もしくは抗菌活性を持った添加剤を添加した製膜方法であれば、上記の問題は解消するように思われる。

付着阻害活性と抗菌活性を比較すると、抗菌活性は菌体が生産する EPS が介在することにより効果が薄れる懸念がある。また、死細胞も既に生産した EPS を介して膜に付着する能力を保持している場合がある<sup>[19]</sup>。このため、抗菌にターゲットを絞るよりも付着阻害を狙った方が、より効果的な対策となりうる。両方の機能を持たせることができれば、効果的な膜改質法といえるかもしれない。

#### ② 膜洗浄

膜洗浄はバイオフィアウリング防止に極めて重要な役割を果たす。洗浄によりファウリング層を膜表面から引き剥がすことができ、洗浄工程最適化ためにはファウリング層-膜表面間の相互作用についての理解や、洗浄効果とその後の膜分離性能の把握が不可欠である。

膜洗浄には物理的な方法（水力学的、空気力学的、力学的、電界）と化学的な方法（酸や塩基、酸化剤や界面活性剤及び酵素の利用）が挙げられる。物理的洗浄で頻繁に用いられるのは水力学的な逆洗浄である。MBR では逆洗浄に加え、通常運転時には空気攪拌を用いることによりファウリングの防止と曝気を兼ねた方法が主流となっている<sup>[20]</sup>。化

学的洗浄には上記の各種試薬が排水の性状に応じて使い分けられる。一般的に、成熟したバイオフィームはこれらの試薬類の浸透に対して抵抗力があるため、化学的方法のみによる洗浄はどうしても効率が悪くなる。また、過度の化学的洗浄は、それによる廃水の増加や膜の寿命の悪化に繋がる<sup>[8]</sup>。そのため、実際の現場では物理的洗浄の後、化学的洗浄を行うことにより洗浄効率を上げている。

#### 3.1.3.4. モジュールデザイン・運転条件の最適化

水処理における膜モジュールとしては、一般的に渦巻き型のものが用いられる。バイオフィアウリング抑制のために実機で可能な検討項目は、膜表面付近における剪断力（速度）の向上と乱流の促進である。そのための操作及び装置設計として、前者は流量の増加と膜表面近傍における流路面積の縮小、後者は適切な箇所へのスパーサの設置やスタティックミキサー（駆動部のない静止型混合器）の使用が挙げられる。しかしながら、乱流の促進は一度生成したバイオフィームへの栄養源供給を促進することにもなってしまう。栄養源が供給されやすい環境下で形成されるバイオフィームは、高密度でコンパクトなものとなり、除去が困難になってしまう。

膜分離活性汚泥法でバイオフィアウリングを抑制するには、液中膜 MBR の場合は曝気の強度を調節することで、クロスフロー型 MBR の場合は混合液の流速を調節することで対応できる。水力学的な条件設定の最適化も重要であり、膜配置やパイロットプラント運用などの試験が重要となる。

#### 3.1.3.5. 微生物制御

##### ① バクテリオファージの利用

バクテリオファージが宿主細菌であるバイオフィーム形成細菌に感染しこれを溶菌・不活性化させる<sup>[21]</sup>ことで、バイオフィーム形成を防止することができる。ベンチスケールの水循環システムでバクテリオファージによる限外ろ過(Ultrafiltration, UF)膜のバイオフィアウリング抑制を評価した報告によると、*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter johnsonii*, *Bacillus subtilis* の3種の細菌の単独、および共培養条件下でバクテリオファージによる膜透過性維持の効果（バイオフィーム抑制の効果）が確認されている<sup>[22]</sup>。

##### ② NO 供与体の利用<sup>[23]</sup>

一酸化窒素(Nitric Oxide, NO)は、バイオフィームの能動的脱離に関与するメッセンジャ

一であることが知られている。NO の蓄積により *P. aeruginosa* のバイオフィルム脱離が促進され、同時に抗生物質耐性も低下することが確認されている。この他にも多くの研究がなされており、NO の蓄積によるバイオフィルムの脱離はグラム陽性・陰性細菌の双方について菌種によらず普遍的に効果があると考えられている。

NO は水に溶けにくく、容易に酸化されてしまうため、バイオフィルム対策として水中に添加してもほとんど効果がない。そのため NO 供与体が利用されており、これがバイオフィルムの脱離に効果を示している。NO 供与体の例として、sodium nitroprusside, 3-morpholinopyridone, sodium nitrite, S-nitroso-N-acetylpenicillamine, diazeniumdiolate が挙げられ、いずれもバイオフィルムの脱離に効果的であることが示されている。ただし、この方法は現時点において *in vitro* でのみ効果が確認されており、パイロットスケールレベルでのさらなる調査が必要である。

### ③ QS の阻害

QS の阻害によってバイオフィルム形成を抑制する試みも多くなされている。第 1 章でも述べたとおり、これは Quorum Quenching (QQ) と呼ばれる。これについては本研究のメインテーマのひとつであるため、次節で詳しく述べる。

## 3.1.4. バイオフィルムと QS

### 3.1.4.1. 既往の研究

一般的に、バイオフィルム内部は高菌体密度であるため QS 制御が活発にはたらいっているとされている。一例として、韓国の水処理施設からサンプリングしたバイオフィルム形成後の RO 膜上の細菌を採取・分析したところ、全体の 60% は何らかの QS シグナル物質を生産し、膜表面への吸着もしやすい菌種であることが報告されており<sup>[24]</sup>、これらの細菌の QS 制御がバイオフィルム防止に繋がることを示唆される。実際に QS 制御によりバイオフィルムの性質や構造が変化する例は数多く報告されており、QS を阻害することでバイオフィルム形成が抑制されるというのが一般的な認識である。QS の制御はすなわちオートインデューサー(AI)の制御であり、その方法は第 1 章の QQ において述べたとおり、AI の包接化、拮抗阻害、分解などである。以下で、バイオフィルムと QS 阻害に関する既往の研究例をいくつか紹介する。

#### ① 拮抗阻害

QS 阻害剤として、2(5H)-furanone は効果があると言われており、添加濃度に依存して

*Chromobacterium violaceum* CV026 株の violacein 生産が減少，すなわち，系内の AHL 濃度が減少し，*Aeromonas hydrophila* のバイオフィーム形成が抑制されることが報告されている<sup>[25]</sup>。これは 2(5H)-furanone が AHL レセプターと結合し，拮抗阻害した結果であると考えられる。また，vanillin も *A. hydrophila* のバイオフィーム形成抑制効果が確認されている<sup>[26, 27]</sup>。Vanillin についても CV026 株の violacein 生産量減少が報告されており，2(5H)-furanone と同様，何らかの形で AHL の生産が阻害されているようである。

## ② QS 関連遺伝子の破壊

遺伝子操作を利用した QS 関連遺伝子の破壊によるバイオフィーム構造の変化を観察した研究例は数多く存在する。例として，*Serratia liquefaciens* の AHL 合成遺伝子 *swrI* の破壊によるスウォーミング運動性の低下とそれに伴うバイオフィーム構造の変化<sup>[28, 29]</sup>，*A. hydrophila* の QS 制御システム *ahyI/ahyR* の破壊によるバイオフィーム構造の変化<sup>[30]</sup>，*Burkholderia cepacia* の QS 制御システム *cepI/cepR* の破壊によるバイオフィーム構造の変化<sup>[31]</sup>などが挙げられる。

複数種の AHL を合成する *Acinetobacter* 属細菌 DR1 株の AHL 合成遺伝子 *aqsI* 破壊株は hexadecane の分解活性が落ちるほか，バイオフィーム形成抑制や細胞表面の疎水性低下が観測された。ただし，このうち hexadecane の分解活性に関しては外部から AHL を添加しても回復せず，QS 制御によるものではないと思われる<sup>[32]</sup>。

### 3.1.4.2. バイオフィーム評価法

バイオフィームの解析は，表面観察によるものが一般的である。これには通常の光学顕微鏡(Light Microscopy)による観察のほか，落射蛍光顕微鏡(Epifluorescence Microscopy, EFM)，透過型電子顕微鏡(Transmission Electron Microscopy, TEM)，走査型電子顕微鏡(Scanning Electron Microscopy, SEM)，環境走査電子顕微鏡(Environmental Scanning Electron Microscopy, ESEM)，原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscopy, AFM)，走査型透過 X 線顕微鏡(Scanning Transmission X-ray Microscopy, STXM)などによる観察が挙げられ，目的や対象に応じて使い分ける<sup>[33]</sup>。赤外(Infrared, IR)や核磁気共鳴(Nuclear Magnetic Resonance, NMR)などの分光技術を利用した観測も適用可能である。以上，各方法の長所や短所については Wolf らの論文<sup>[34]</sup>に表にして簡潔にまとめてある。

また，96 穴マイクロタイタープレート中で培養・形成させたバイオフィームを染色し，その吸光度を定量する方法が考案<sup>[35]</sup>されて以来，この方法はバイオフィーム形成量を知

るための簡便な手法として広く活用されてきた。本研究でも、バイオフィーム評価法として 96 穴プレートを用いたバイオフィーム形成量測定と、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) によるバイオフィーム構造観察を軸として実験を進めた。CLSM を用いた構造観察については、観察の前に LIVE/DEAD 染色を行った。そのため、本研究では生きた状態のバイオフィーム評価には至っていない。

近年では、バイオフィーム形成過程の細菌に蛍光を発現させることで、生きた状態のバイオフィームを観察可能な技術が確立されている<sup>[36]</sup>。また、さらに一歩進んで、蛍光発光や環境条件に依存しない新規なバイオフィーム非破壊解析技術として、反射顕微鏡法を基礎とした Continuous-Optimizing Confocal Reflection Microscopy (COCRM) も開発されている<sup>[37]</sup>。経時性や定量性に富んだ、このような技術が普及することで、今後のバイオフィーム研究はさらに発展していくものと考えられる。

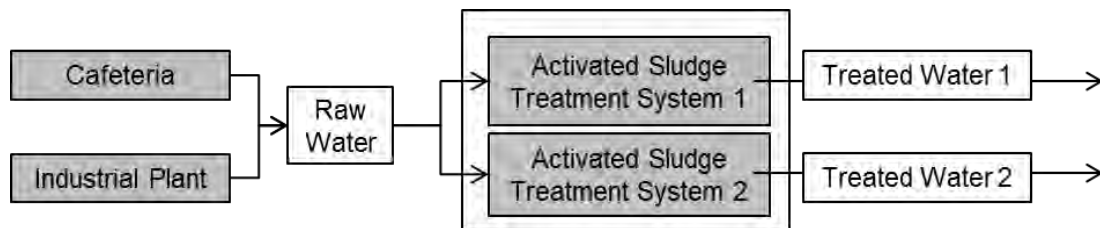
### 3.1.5. 研究の目的

本章では活性汚泥処理システムで用いる膜のバイオフィウリングに関連し、その構成細菌による QS の影響評価を行うことを目的とした。まず、QS に関与する細菌として、活性汚泥処理システムより AHL 合成細菌を単離した。その中からモデル細菌を選定し、AHL 合成遺伝子を破壊した。これら野生株と各遺伝子破壊株を用い、種々の条件下でバイオフィームの形成評価試験を実施した。その結果をもとに、該当菌株の AHL を介した QS によるバイオフィーム形成制御機構について考察を行った。

## 3.2. サンプリングと AHL 合成細菌スクリーニング

### 3.2.1. 菌のサンプリングと単離

本実験で用いた菌サンプルは、活性汚泥処理を行う工場内の下水より採取した。工場の廃水処理系統とサンプル採取箇所を Fig. 3-2 に示す。これを 1/2 LB 寒天培地上で培養し、単離を行った。



**Fig. 3-2 Flow diagram of industrial wastewater treatment system**

Bacterial strains were isolated from three different wastewater samples: Raw Water, Treated Water 1 and Treated Water 2, as shown in the diagram.

### 3.2.2. AHL 合成細菌のスクリーニングと菌の選定

単離したコロニーからの AHL 合成細菌のスクリーニングは以下の手順で行った。96 穴プレートのウェル中に LB 寒天培地を用意し、各ウェルの上方部に単離した各コロニーを、左下方部に短鎖 AHL レポーター株である *Chromobacterium violaceum* CV026 株を、右下方部に長鎖 AHL レポーター株である同 VIR07 株を植菌し (Fig. 3-3 参照)、30°C で一晩培養した。その後、violacein が生産されていたウェル中の単離コロニーについて、PCR を用いて 16S rRNA 遺伝子を増幅して塩基配列を決定し、国際塩基配列データベースを用いて細菌種を同定した。

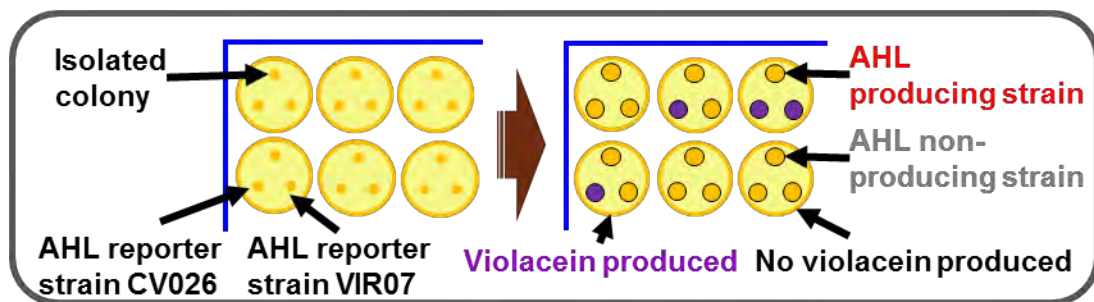


Fig. 3-3 Screening of AHL-producing strain using 96-well plate

Isolated colonies were inoculated into each well of the plate containing LB agar medium. Two types of AHL reporter strains, CV026 and VIR07, were inoculated afterwards in each of the well. Isolated colonies were selected as an AHL producing strain in the case when either one of (or both of) the strains exhibit violacein production.

結果を Table 3-1 に示す. 第 1 章にて, 栃木県内 7 ヶ所の浄化センターの活性汚泥から単離した AHL 合成細菌は 95%以上が *Aeromonas* 属細菌であったことを紹介したが, 本実験で採取した工場内下水からも同様に高い割合で *Aeromonas* 属細菌が単離された. このうち, 最も存在割合の高かった *A. hydrophila* R2 株を調査対象として選定し, 以下の実験を実施した.

Table 3-1 AHL-producing strain screened from industrial wastewater treatment system

species	location	number of strains isolated	total
<i>Aeromonas punctata</i>	Raw water	13	23
	Treated water 1	10	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Raw water	27	103
	Treated water 1	53	
	Treated water 2	23	
<i>Aeromonas veronii</i>	Treated water 1	1	27
	Treated water 2	26	
<i>Aeromonas jandaei</i>	Treated water 2	1	1
<i>Pseudomonas otitidis</i>	Treated water 2	3	3

### 3.3. AHL 合成遺伝子破壊株の作製と確認

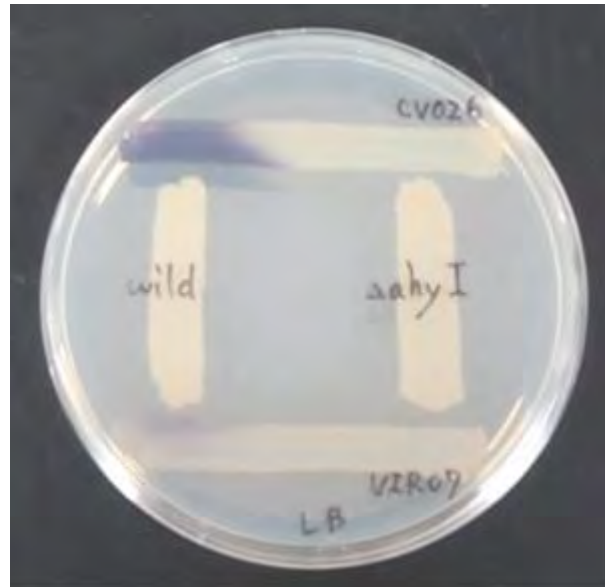
#### 3.3.1. AHL 合成遺伝子破壊株の作製

*A. hydrophila* R2 株（以下，単に R2 株とする）より染色体を抽出し，AHL 合成遺伝子を PCR で増幅し，これをクローニングベクター pGEM-T easy へライゲーションした．ここから AHL 合成遺伝子の内部配列をプライマー：5'-TCT GCA TGC AGC TTT ATC GCT TTC GCA ATC GCG-3'および 5'-TCT GTC GAC ATC CAG ATG GAA GCG GAT CCC CAC-3'を用いて PCR で増幅し，カナマイシン耐性遺伝子を持つベクター pJP5603 へライゲーションした．このプラスミドをエレクトロポレーションにより R2 株へ導入し，プラスミドを染色体に巻き込ませることで遺伝子の組換えを行った．この際，カナマイシンを添加した LB 寒天培地で生育したコロニーを AHL 合成遺伝子破壊株として以降の試験に用いた．

#### 3.3.2. AHL 合成遺伝子破壊株の確認

まず，作製した AHL 合成遺伝子破壊株を R2 野生株とともに AHL レポーター株 CV026 および VIR07 と LB 寒天培地上でクロスストリーキングし，violacein 生産を確認した．その結果を Fig. 3-4 に示す．





**Fig. 3-4 Cross-streaking of R2 strain and AHL reporter strains**

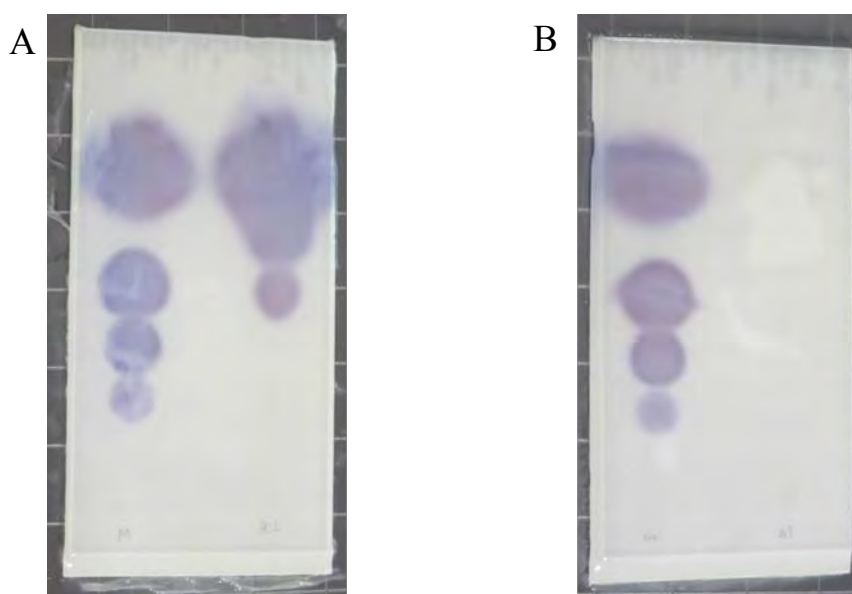
AHL production of R2 wild type strain and its *ahyI* mutant strain was confirmed by AHL reporter strains CV026 and VIR07. AHL reporter strains exhibited no violacein production for *ahyI* mutant strain, indicating that AHL synthase gene was disrupted successfully.

R2 野生株とストリーキングさせた CV026 株が violacein 生産を示した。これより、R2 野生株が短鎖 AHL を生産していることが確認できた。また、AHL 合成遺伝子破壊株とストリーキングさせた CV026 株および VIR07 株は、いずれも violacein を生産しなかった。このことから、R2 野生株では機能していた AHL 合成遺伝子が破壊されたことが確認できた。

R2 株が生産する AHL の種類を特定するために、R2 野生株と AHL 合成遺伝子破壊株を LB 液体培地で培養し、上澄み液から AHL を抽出して薄層クロマトグラフィー(Thin-Layer Chromatography, TLC)により分離後、AHL レポーター株を用いて確認を行った。LB 液体培地(100 mL)を用意し、各菌株を接種後、一晚培養した(30°C)。これを複数のチューブに分取して遠心分離後、上澄み液を集めて真空引きし、溶存酸素を脱気させた。ロータリーエバポレーターを用いて溶液を一定量蒸発させてから残存溶液を分液漏斗へ移し、これに酢酸エチル(80 mL)を加えて有機物を抽出した。水相を廃棄し、残存の酢酸エチルをロータリーエバポレーターで完全に乾固させ、これにジメチルスルホキシド(Dimethylsulfoxide, DMSO, 500  $\mu$ L)を加えて抽出物を溶解させた。この溶液を用いて、TLC による成分分離を

実施した。TLC のプレートには逆相シリカゲルを、展開溶媒には 60%メタノール水溶液を用いた。AHL 標準溶液として、あらかじめ合成した C4-HSL, C6-HSL, C7-HSL, C8-HSL の混合溶液を用いた。プレート下部の 2 点に上澄み抽出サンプルと AHL 標準溶液サンプルをそれぞれ 1  $\mu$ L 滴下し、デシケーター中の展開溶媒に浸して分離を開始した。約 50 min 経過後、プレートを取り出し、LB 液体培地(4 mL)で一晩培養した CV026 株(30°C)を含ませた LB 培地(50 mL, 0.3% agar)をプレート上に噴霧した。このプレートを一晩培養(30°C)し、翌日に CV026 株による violacein 生産の有無を確認した。

結果を Fig. 3-5 に示す。A が R2 野生株の結果であり、B が AHL 合成遺伝子破壊株の結果である。それぞれ左側に AHL 標準溶液を、右側に菌体の培養液から抽出した AHL をプレート下方に滴下し、展開溶媒で分離した後に violacein 生産を確認したものである。これにより、R2 野生株が C4-HSL およびわずかに C6-HSL を生産しており、AHL 合成遺伝子破壊株はそれらの生産能力がなくなっていることが確認できた。



**Fig. 3-5 AHL detected by thin layer chromatography**

(A) Result of R2 wild type strain, and (B) result of *ahyI* mutant strain. Violacein spots on the left side of each plate are the result of standard AHL solution. Four violacein spots indicate C4-HSL, C6-HSL, C7-HSL, and C8-HSL, from top to the bottom, respectively. C4-HSL and C6-HSL are produced in the R2 wild type strain.

### 3.4. バイオフィーム評価試験～概要と実験準備～

#### 3.4.1. 緒言と実験概要

本研究は QS を軸としているが、バイオフィーム形成に影響を与える要因は当然ながら QS だけではなく、Table 3-2 のような多岐に渡る要因が挙げられる。このうち細菌の特性や細菌の分泌物の変化によるバイオフィーム形成への影響評価は何らかの遺伝子改変を要すると考えられ、かつ制御系も多岐で不明な点が多い。よって、現実的に容易に操作・変更が可能な要因としては、付着基質および液体培地の流量・流速や組成・濃度となる（ただし、付着基質は、評価系に CLSM を用いる場合は透明性の高い材質に限定される）。本研究ではこのうち、付着基質によるバイオフィーム形成への影響を、QS による影響と合わせて評価することとした。

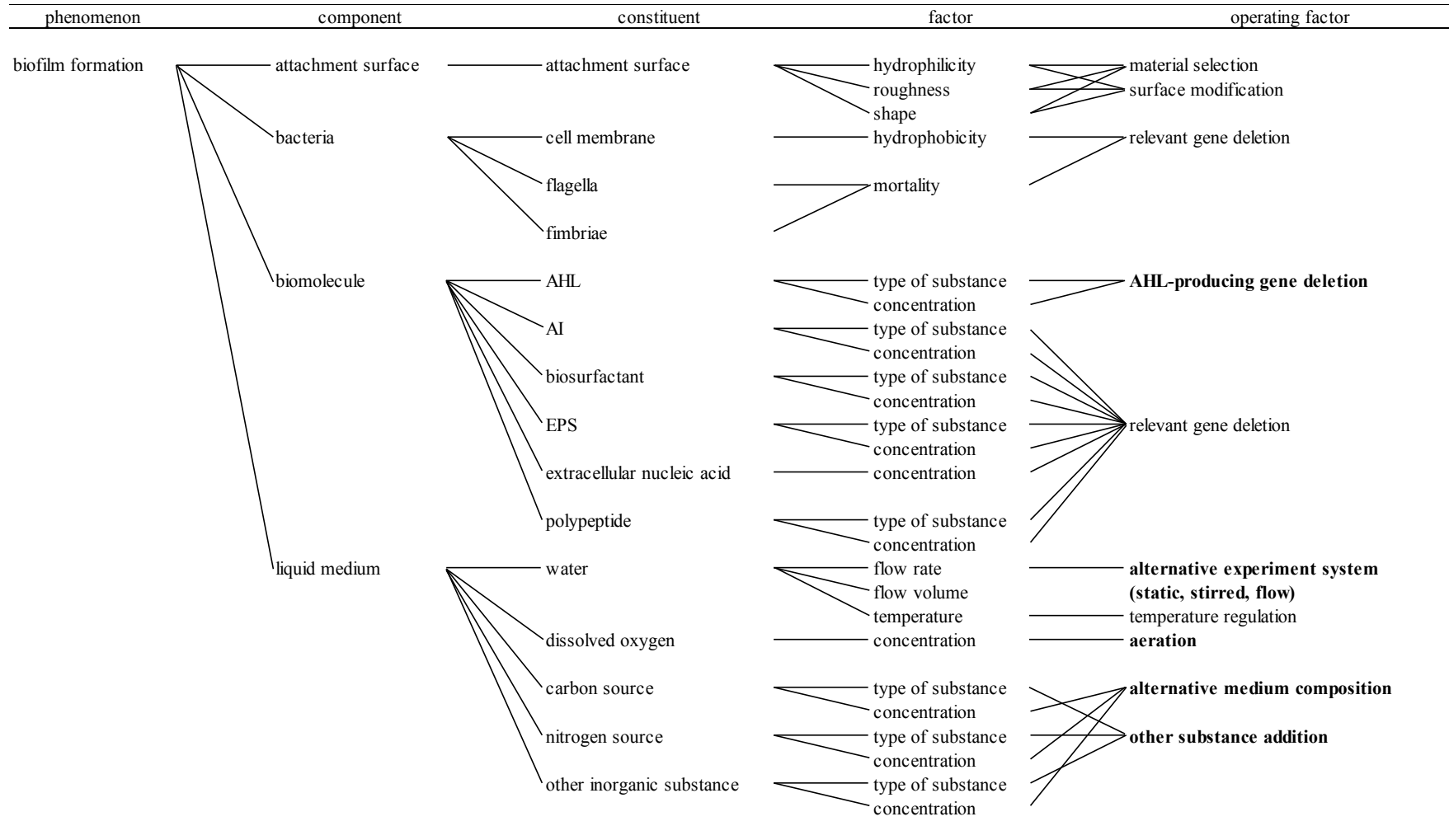
付着基質には 96 穴マイクロタイタープレート（ポリプロピレン製）、カバーガラス（白板）の 2 種類を用いた。実験系については、バッチ式の静置試験のみを実施した。

#### 3.4.3. 実験準備～菌体増殖の確認～

以降のバイオフィーム形成試験では、すべての試験で R2 野生株および AHL 合成遺伝子破壊株を用い、場合によっては本研究室で合成した C4-HSL を添加している。ある菌株による QS の影響を評価する際には、その菌株の評価にかかわる要因が増殖阻害要因になっていないかどうかを確認する必要がある。本節では実験準備として、C4-HSL を添加した際の R2 野生株および AHL 合成遺伝子破壊株の増殖曲線の確認を行った。

実験は、定常期まで前培養した R2 野生株および AHL 合成遺伝子破壊株を新たな LB 液体培地(4 mL)に 1%量を投入(40  $\mu$ L)し振とう培養したものを、一定時間ごとに採取(100  $\mu$ L)して滅菌水(900  $\mu$ L)で希釈し OD<sub>600</sub> を測定した。C4-HSL は以降のバイオフィーム形成試験の水準と同様、最終濃度が 10  $\mu$ M となるように添加した。結果は Fig. 3-6 および Fig. 3-7 に示したとおり、10  $\mu$ M の C4-HSL では菌体増殖に影響は出なかった。ただし、AHL 合成遺伝子破壊株の菌体増殖は R2 野生株と比較してわずかに低下しているように思われた。なお、これらのグラフは培養液希釈後の OD<sub>600</sub> 測定値を示しているため、元の培養液の OD<sub>600</sub> は各グラフの縦軸に示した値の 10 倍となる。

**Table 3-2 Factors which may possibly influence biofilm formation**



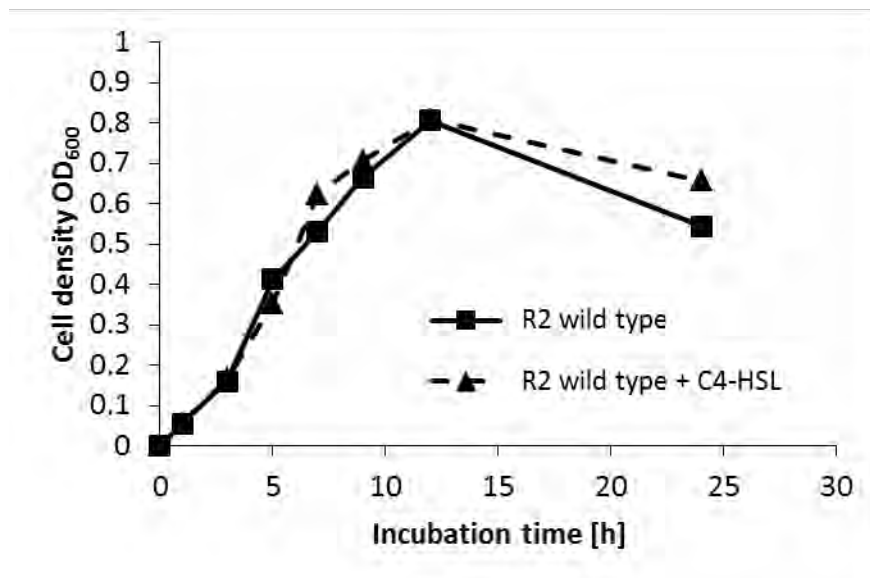


Fig. 3-6 Bacterial growth of R2 wild type strain

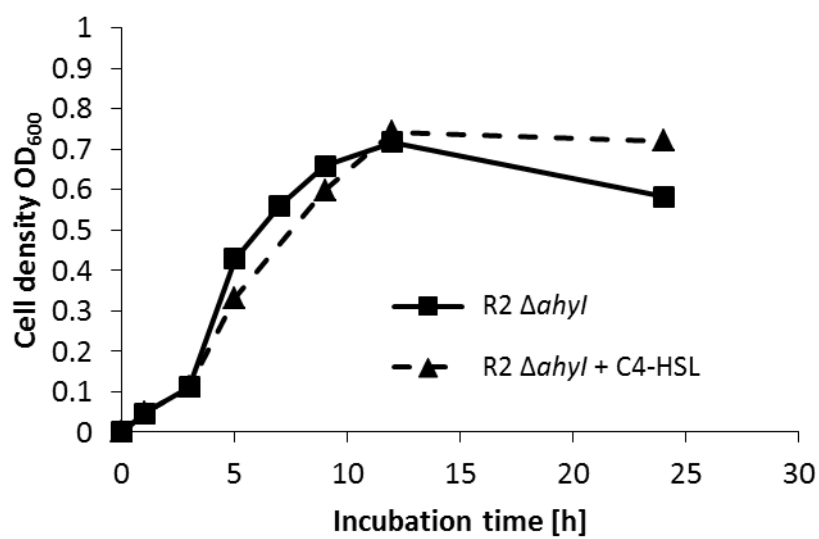


Fig. 3-7 Bacterial growth of R2  $\Delta$ ahyI strain

### 3.5. 96 穴プレートを用いたバイオフィーム定量試験

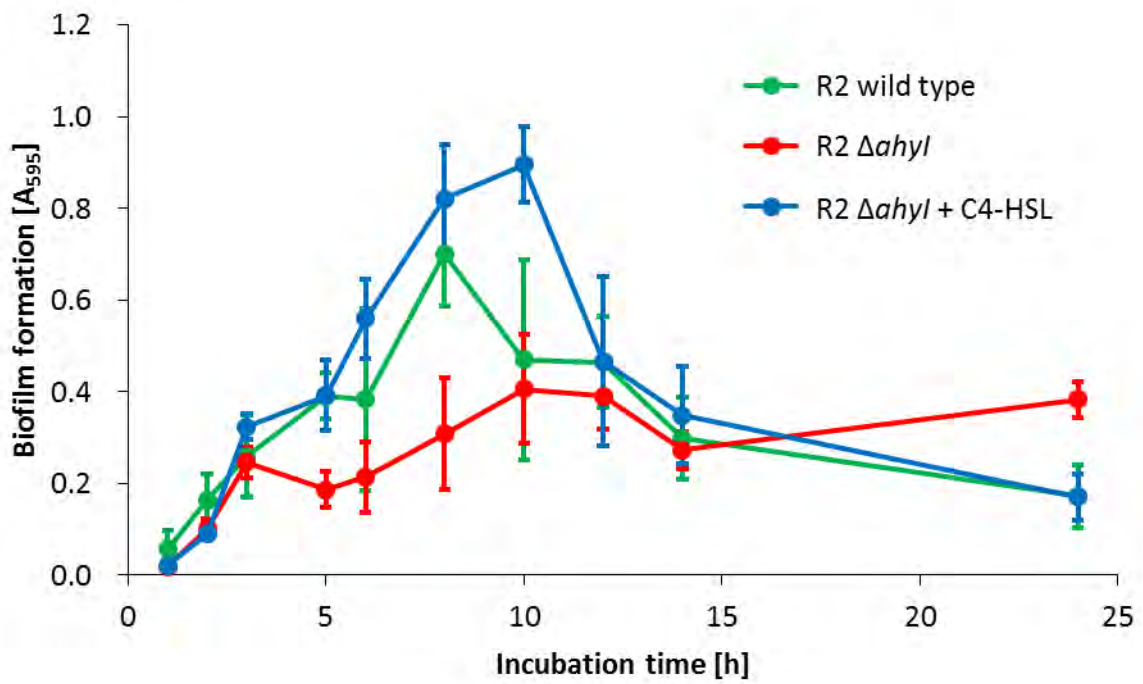
#### 3.5.1. 実験方法

R2 株は LB 液体培地(4 mL)にて前培養(30°C)を行った。一晚培養後, OD<sub>600</sub> の値を確認し, R2A 液体培地 900  $\mu$ L 中に 9  $\mu$ L (1%相当) を接種した。これを 96 穴マイクロタイタープレートのウェルに 100  $\mu$ L ずつ分注した。この際, プレート 1 列分のウェルを 1 水準用として用いた(8 wells, 800  $\mu$ L)。AHL 合成遺伝子破壊株についても同様の操作を行い, 条件によっては C4-HSL を最終濃度 10  $\mu$ M となるように投入した。また, コントロールとして R2A 液体培地のみ水準を用意した。分注が終了したプレートはインキュベーター中に静置(30°C, ~24 h)し, バイオフィームを形成させた。

培養後, インキュベーターからプレートを取り出し, 各ウェルに 0.1%クリスタルバイオレットを滴下(30  $\mu$ L)し, 約 20 min 放置してバイオフィームを染色した。その後, 壁面に付着したバイオフィームを吸引しないように注意しながらアスピレーターを用いて液体培地を吸引した。各ウェルを純水(400  $\mu$ L)で洗浄後, 再びアスピレーターを用いて液体を吸引し, 各ウェルに 99.5%エタノール(100  $\mu$ L)を加えてクリスタルバイオレットを溶解させ, マイクロプレートリーダーを用いて波長 595 nm における吸光度を測定した。

#### 3.5.2. 実験結果と考察

結果を Fig. 3-8 に示す。培養開始から 5~8 h におけるバイオフィーム形成量は, R2 野生株と比較して AHL 合成遺伝子破壊株では減少したが, これに外部から C4-HSL を添加することで R2 野生株と同程度の水準まで回復した。この時間帯では, C4-HSL を介した QS によりバイオフィーム形成量が制御されていると考えられる。その後, 10 h を経過したあたりから 24 h 後まで, R2 野生株および AHL 合成遺伝子破壊株に外部から C4-HSL を添加した条件においてバイオフィーム形成量の減少がみられ, この間にバイオフィームが徐々に脱離しているように思われた。AHL 合成遺伝子破壊株のバイオフィーム形成量は, 24 h の実験時間を通して低めの水準で推移した。総じて, AHL の存在下ではバイオフィームの形成量の増加がみられるとともに, その後の脱離についても促進される結果となった。



**Fig. 3-8 Biofilm formation of R2 strain within 24 h incubation**

Result of biofilm formation on 96-well plates. Biofilm formation was accelerated in the existence of C4-HSL during 5 ~ 8 h period. In such conditions, dispersal took place after 10 h has passed. Biofilm formation of R2  $\Delta ahyl$  strain was relatively low throughout the experiment.

### 3.6. カバーガラスを用いたバイオフィーム評価試験

#### 3.6.1. 実験方法

##### ① 実験系と条件設定

R2 株の前培養は前節の実験と同様に実施した。スクリー管に R2A 培地(10 mL)を用意し、培養した R2 野生株を 100  $\mu$ L (1%相当) 投入した。ここにクリップを用いてカバーガラスを挟み、Fig. 3-9 に示すとおりに吊るしてカバーガラスの一部が浸るようにした。この状態でインキュベーター中に静置(30°C, ~120 h)し、バイオフィームを形成させた。AHL 合成遺伝子破壊株の試験やその際の C4-HSL の添加については前節と同様に実施した。それぞれの図における実験条件は Table 3-3 にまとめて示した。

なお、カバーガラスを R2A 培地中に浸漬させずに吊るして試験を実施した理由は、気液界面におけるバイオフィーム形成を培地中のそれと比較するためである。前節の 96 穴プレートでの試験において、クリスタルバイオレット染色後のウェル内を観察すると、特に気液界面部の着色が目立つ傾向があった。そのため、気液界面におけるバイオフィームの構造や形成量はバルク溶液中のそれとは異なる可能性が考えられた。また、バイオフィームを形成させない面を設けることで、顕微鏡観察の際にその部分が蛍光発光していないことを確認するためのネガティブコントロールの意味も兼ねている。



**Fig. 3-9 Image of cover glass experiment**

Cover glass was partially dipped into the R2A medium inoculated with R2 strain and incubated at 30°C. See Table 3-3 for further experimental condition.

##### ② 染色と評価系

培養後、カバーガラスをシャーレに移し、FilmTracer™ LIVE/DEAD Biofilm Viability Kit により染色を行った。本キットは核酸を緑色蛍光染色する SYTO 9 と赤色蛍光染色する propidium iodide (PI)からなり、前者は細胞膜を透過してすべての核酸を、後者は細胞膜透



過がなく、膜にダメージがある核酸のみを染色する。PIにより染色された核酸は SYTO 9 による蛍光が減衰するため、結果的に生細胞が SYTO 9 で染色され、死細胞が PI で染色されたことになる。この SYTO 9 および PI それぞれ 3  $\mu$ L を 1000  $\mu$ L の滅菌水に混合したものを用意し、カバーガラスのバイオフィーム生成面へ 300  $\mu$ L 程度を滴下した。暗所で 30 min 程度放置した後、純水で穏やかに 2~3 回洗浄し、その後純水に浸した状態のものを共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) で観察した。

すべての CLSM 観察は上記のサンプル作製から 3 h 以内に実施し、対物レンズ倍率は 10 x 10 に固定して観察した。気液界面およびバルク溶液中におけるバイオフィーム形成箇所のうち、それぞれ複数箇所の蛍光発光を目視観察し、そのうちの各 1 箇所ずつを代表点として画像撮影を実施した。観察されたバイオフィームの厚さにかかわらず、厚さ方向 (z 軸方向) に焦点距離を変えながら 50 枚の 2 次元 (x-y 平面) 画像を撮影・積層し、3 次元画像として出力した。画像の観察・撮影・解析には FLUOVIEW FV1000-D (倒立顕微鏡 IX81 仕様, Olympus 社) を用いた。

### ③ 解析～バイオフィーム膜厚の概算～

撮影した 2 次元画像のデータを元に、バイオフィームの膜厚を概算した。また、出力した 3 次元画像に対して 2 値化処理を行い、バイオフィームの表面被覆率を算出した。それぞれの方法については appendix B に記した。

## 3.6.2. 実験結果

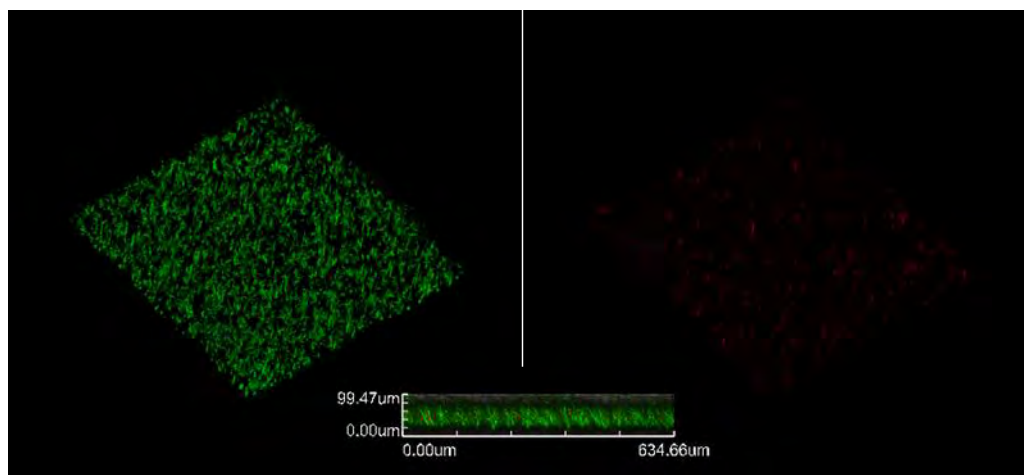
Fig. 3-10 から Fig. 3-26 に、CLSM にて撮影した画像の 3 次元出力結果を示す。Fig. 3-10 から Fig. 3-18 までは水中に完全に浸漬した部分のカバーガラス表面の蛍光発光の観察結果であり、Fig. 3-19 から Fig. 3-26 までは気液界面におけるカバーガラス表面の蛍光発光の観察結果である。各図の左側は生細胞の結果を、右側は死細胞の結果を示しており、中央には z 軸を縦軸としてバイオフィーム厚さの目安になるスケールを示した。

また、算出したバイオフィーム膜厚の値を Fig. 3-27 に、表面被覆率の値を Fig. 3-28 にそれぞれ示す。

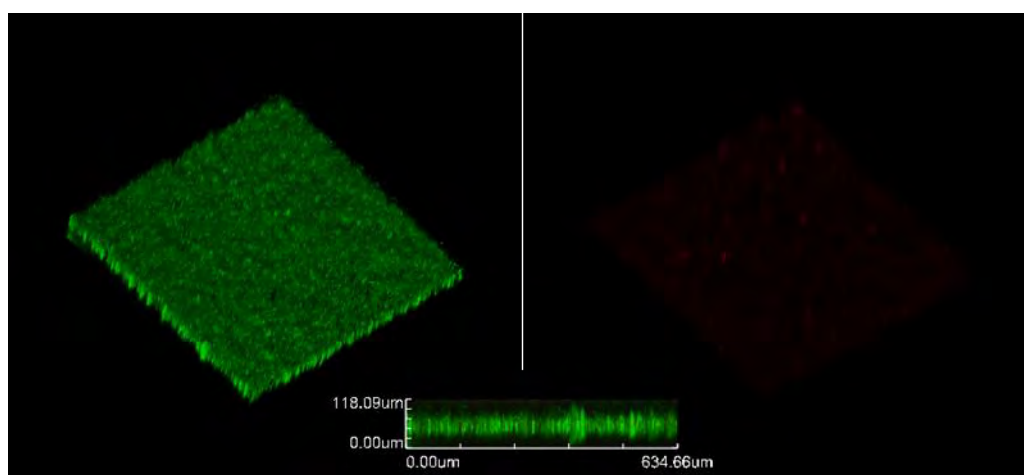
**Table 3-3 Experimental condition and observation point of each figure**

figure	bacterial strain	compound addition	incubation time [h]	forming part
3-11			24	
3-12	R2 wild type		72	
3-13			120	
3-14			24	bulk
3-15	R2 $\Delta$ <i>ahyI</i>		72	aqueous
3-16			120	phase
3-17			24	
3-18	R2 $\Delta$ <i>ahyI</i>	+C4-HSL	72	
3-19			120	
3-20			24	
3-21	R2 wild type		72	
3-22			120	
3-23			24	gas-liquid
3-24	R2 $\Delta$ <i>ahyI</i>		72	interface
3-25			120	
3-26	R2 $\Delta$ <i>ahyI</i>	+C4-HSL	24	
3-27			72	

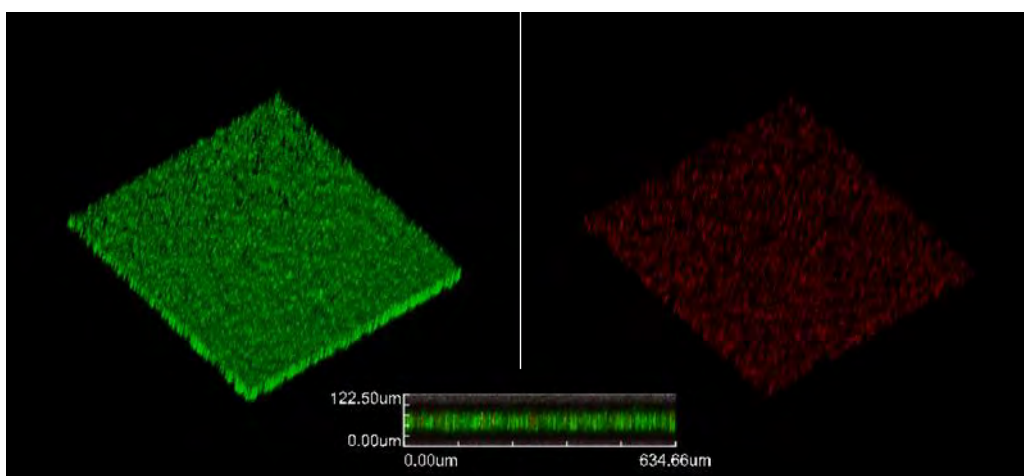
R2 野生株のバイオフィルム形成量



**Fig. 3-10 Biofilm formation of R2 wild type strain after 24 h incubation**



**Fig. 3-11 Biofilm formation of R2 wild type strain after 72 h incubation**



**Fig. 3-12 Biofilm formation of R2 wild type strain after 120 h incubation**

AHL 合成遺伝子破壊株のバイオフィーム形成量

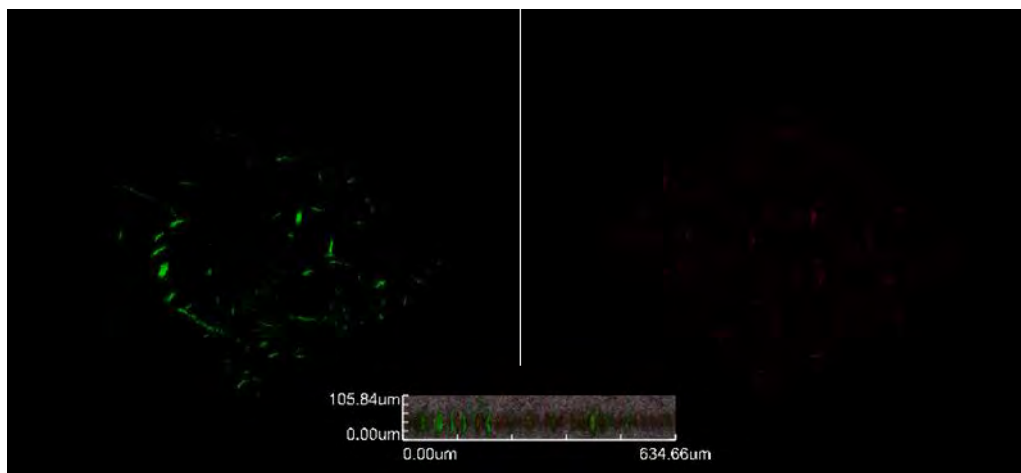


Fig. 3-13 Biofilm formation of R2  $\Delta$ ahyI strain after 24 h incubation

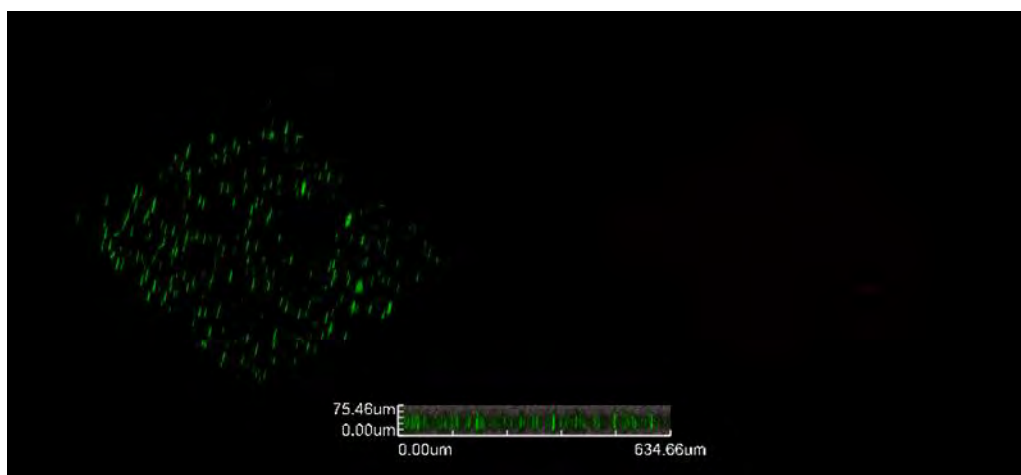


Fig. 3-14 Biofilm formation of R2  $\Delta$ ahyI strain after 72 h incubation

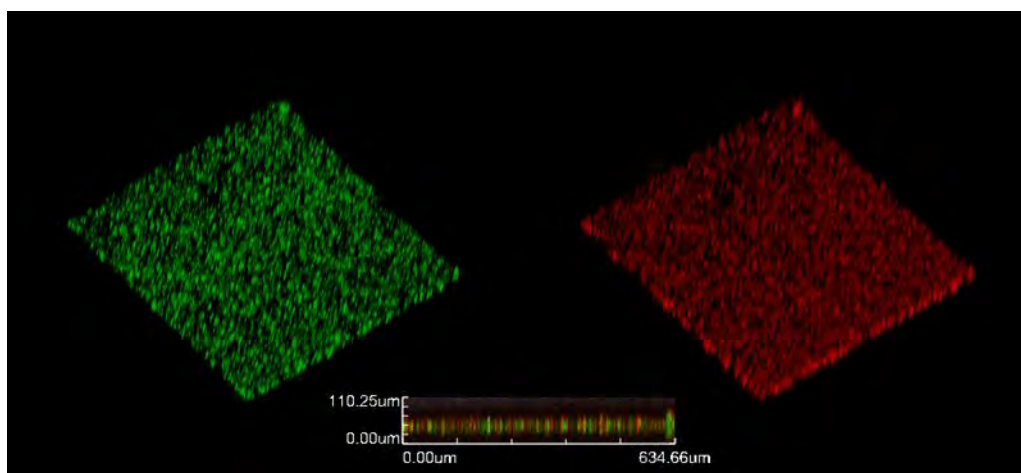
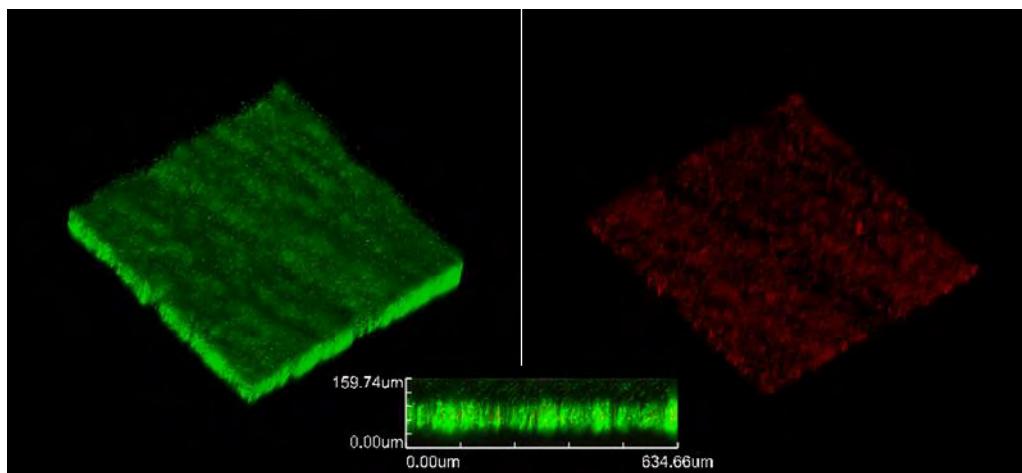
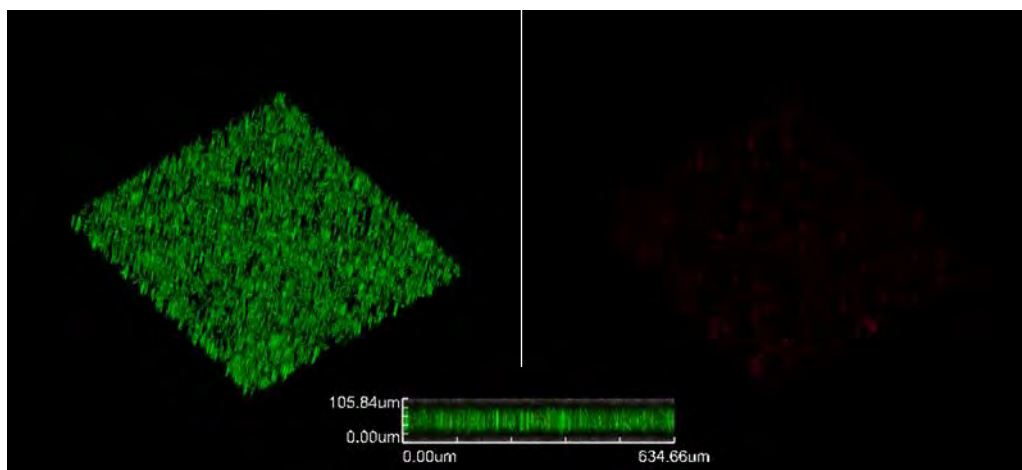


Fig. 3-15 Biofilm formation of R2  $\Delta$ ahyI strain after 120 h incubation

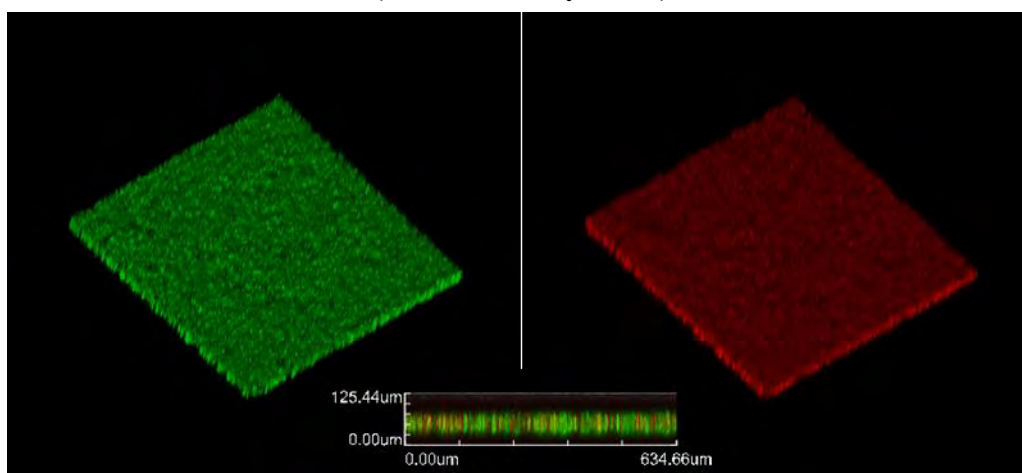
AHL 合成遺伝子破壊株 (C4-HSL 添加) のバイオフィーム形成量



**Fig. 3-16** Biofilm formation of R2  $\Delta ahyl$  strain after 24 h incubation (C4-HSL initially added)

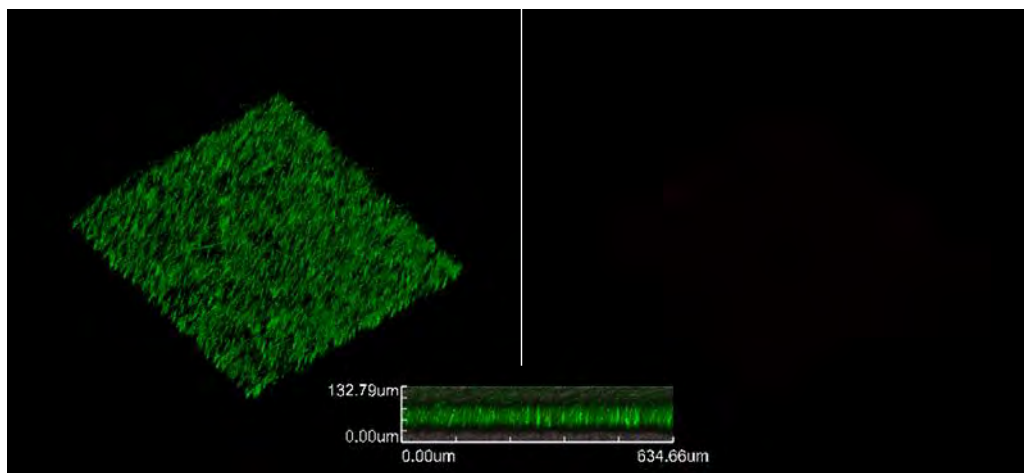


**Fig. 3-17** Biofilm formation of R2  $\Delta ahyl$  strain after 72 h incubation (C4-HSL initially added)

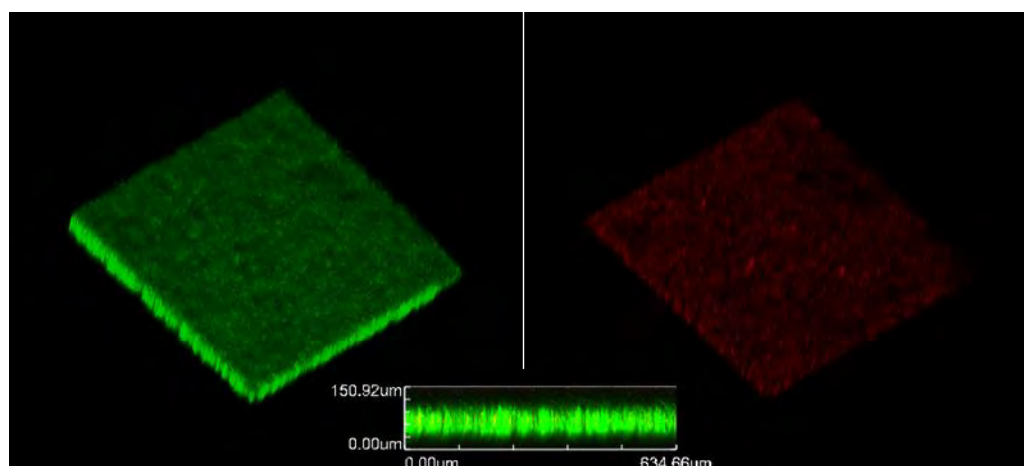


**Fig. 3-18** Biofilm formation of R2  $\Delta ahyl$  strain after 120 h incubation (C4-HSL initially added)

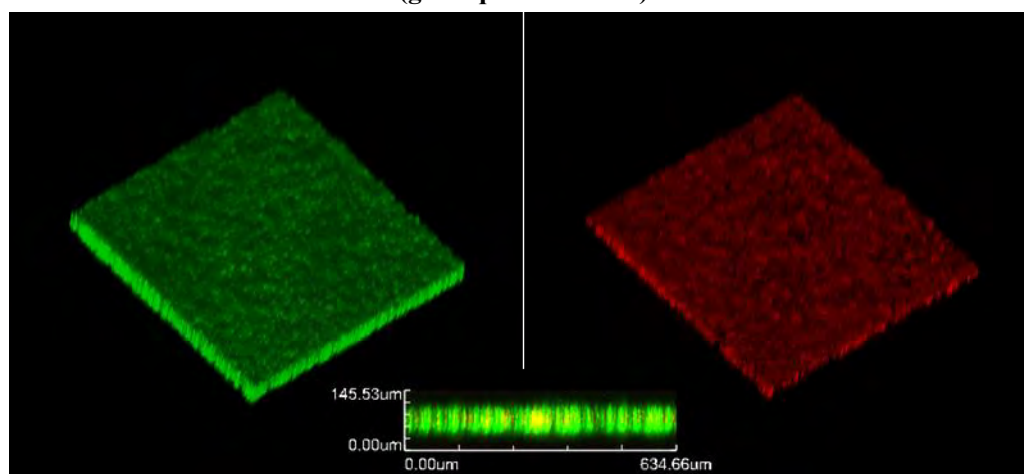
R2 野生株のバイオフィルム形成量 (気液界面)



**Fig. 3-19 Biofilm formation of R2 wild type strain after 24 h incubation (gas-liquid interface)**

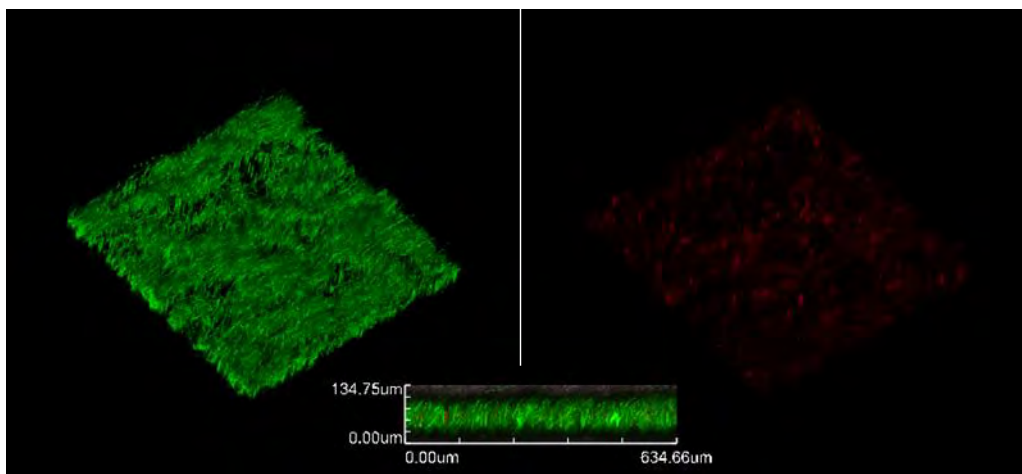


**Fig. 3-20 Biofilm formation of R2 wild type strain after 72 h incubation (gas-liquid interface)**

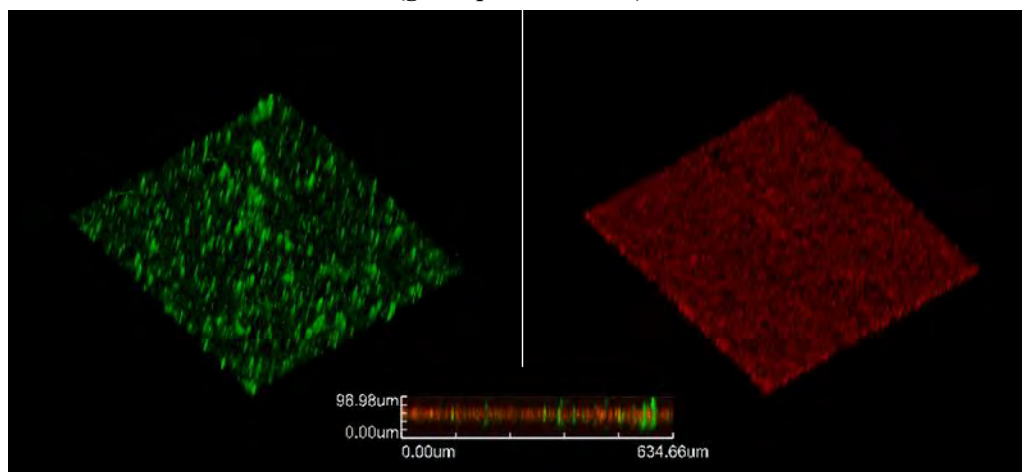


**Fig. 3-21 Biofilm formation of R2 wild type strain after 120 h incubation (gas-liquid interface)**

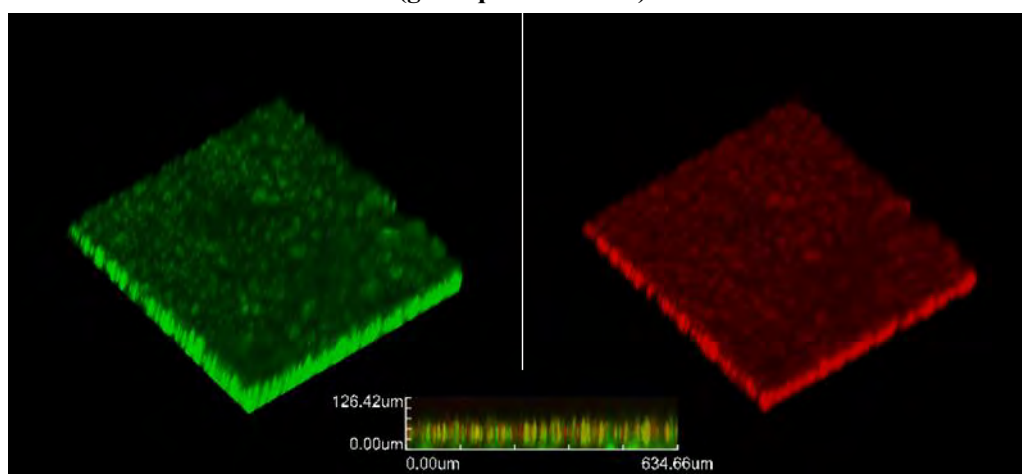
AHL 合成遺伝子破壊株のバイオフィーム形成量 (気液界面)



**Fig. 3-22** Biofilm formation of R2  $\Delta ahyl$  strain after 24 h incubation  
(gas-liquid interface)

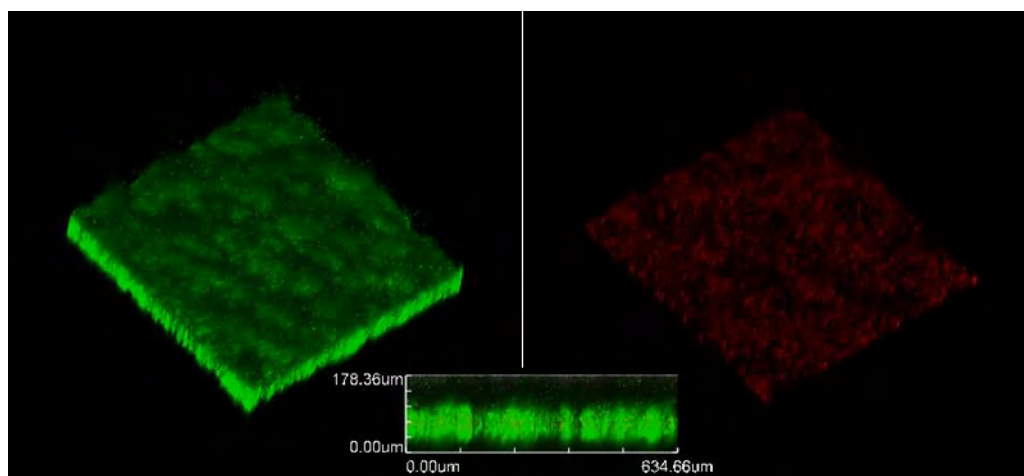


**Fig. 3-23** Biofilm formation of R2  $\Delta ahyl$  strain after 72 h incubation  
(gas-liquid interface)

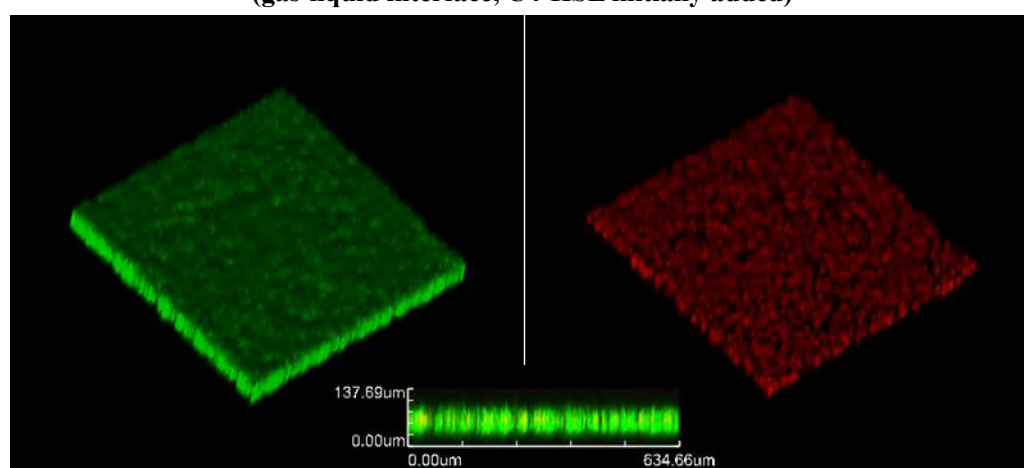


**Fig. 3-24** Biofilm formation of R2  $\Delta ahyl$  strain after 120 h incubation  
(gas-liquid interface)

AHL 合成遺伝子破壊株 (C4-HSL 添加) のバイオフィーム形成量 (気液界面)

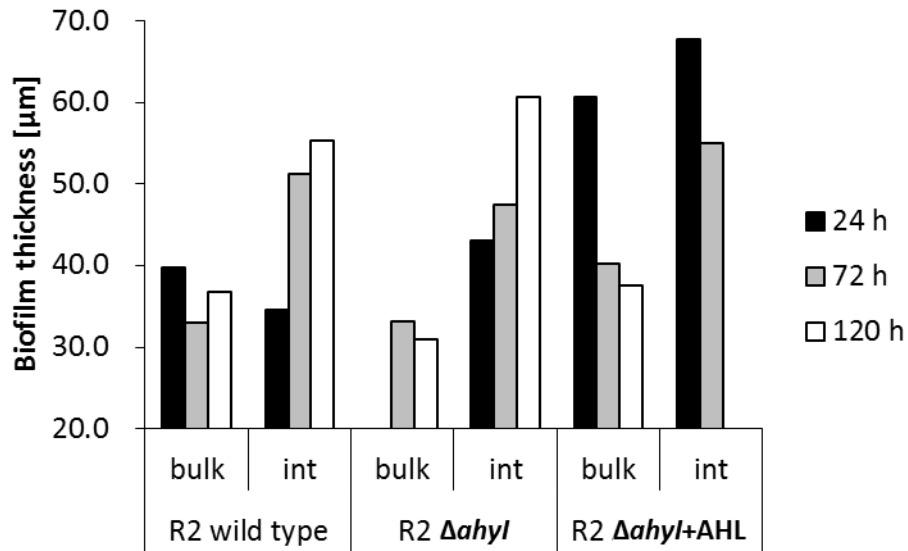


**Fig. 3-25 Biofilm formation of R2  $\Delta ahyl$  strain after 24 h incubation (gas-liquid interface, C4-HSL initially added)**



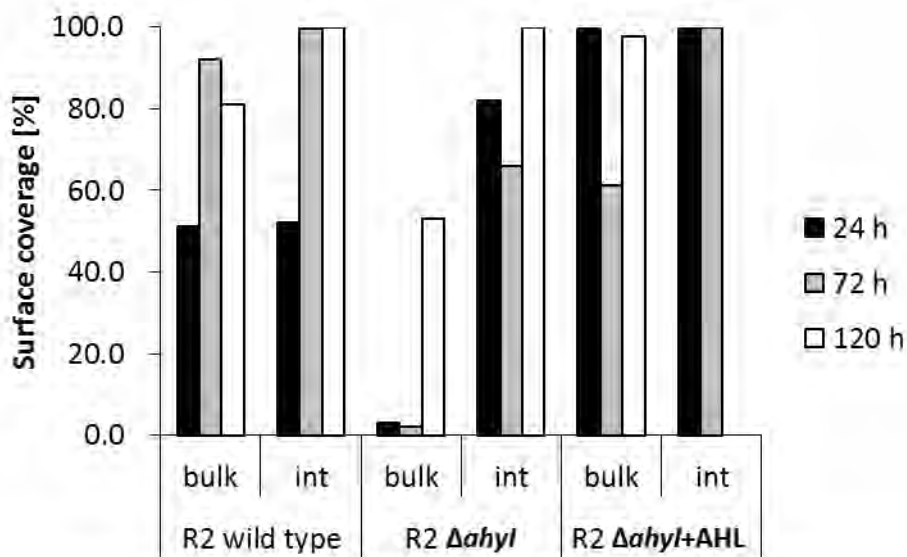
**Fig. 3-26 Biofilm formation of R2  $\Delta ahyl$  strain after 72 h incubation (gas-liquid interface, C4-HSL initially added)**





**Fig. 3-27 Estimated biofilm thickness in all conditions experimented in this study**

Calculation method is described in appendix B. “int”, represents the result obtained from the biofilm formed on the gas-liquid interface of the cover glass. Biofilm thickness was unable to evaluate in condition using R2  $\Delta$ ahyI strain after 24 h incubation in bulk aqueous phase, due to the scarce formation of biofilm.



**Fig. 3-28 Estimated biofilm surface coverage in all conditions experimented in this study**

Calculation method is described in appendix B.

### 3.6.3. 考察

全体的に、気液界面におけるバイオフィーム形成量はバルク溶液中における形成量を上回った。これは 96 穴プレートの試験で得られた結果と同様の傾向であった。

まず、バルク溶液中における各条件のバイオフィーム形成量を比較すると、R2 野生株と AHL 合成遺伝子破壊株では両者とも時間経過とともにバイオフィームの形成量が増加した。しかし、AHL 合成遺伝子破壊株ではその形成速度が遅く、AHL を介した QS によりバイオフィーム形成量が制御されていることが考えられた。この傾向は 96 穴プレートの試験で得られた結果と同様であったが、両者が QS 制御を示す時間帯は試験間で異なっていた。96 穴プレートの試験では培養開始後 5~8 h において顕著な QS 制御の傾向を示していたが、本試験では試験開始から 120 h 経過するまで AHL 合成遺伝子破壊株の形成するバイオフィームが抑制された結果となった。これは同じ静置系の試験でも付着基質の違いや系のスケールの違いが影響した可能性がある。AHL 合成遺伝子破壊株に外部から C4-HSL を加えた条件では、72 h および 120 h 経過後は R2 野生株と同等程度のバイオフィーム形成量を示したが、24 h 経過後のバイオフィーム形成量のみが非常に高い結果となった (Fig. 3-16 参照)。24 h から 72 h が経過するまでの間に、形成されたバイオフィームのうち、かなりの部分が脱離してしまったように見える。24 h 経過後のみ、R2 野生株と AHL 合成遺伝子破壊株に外部から C4-HSL を加えた条件の間で明らかな差があるが、培養初期から AHL が豊富に存在することにより、付着の促進など何らかの影響が出たものと考えられる。もっともこれは 96 穴プレートの試験では見られなかった傾向である。

次に、気液界面におけるバイオフィーム形成量についてであるが、これはバルク溶液中における形成量と比較すると、すべての条件および時間帯でバルク溶液中と同等か、もしくはそれを上回る形成量となった。これは 96 穴プレートの試験において、クリスタルバイオレット染色後、特に気液界面付近に色素が強く残っていたことから、気液界面においては付着基質等によらず同様の傾向があることを示すもので、バイオフィームの形成に酸素の有無が深く影響していることが考えられた。時間帯ごとのバイオフィーム形成の推移についても、AHL 合成遺伝子破壊株に外部から C4-HSL を加えた条件の 24 h 経過後のバイオフィーム形成量が他の条件と比較して高い (Fig. 3-25 参照) ことも含め、バルク溶液中における傾向と概ね同様であった。また、バルク溶液中と比較して全体的に生細胞だけでなく死細胞が増加していることも特徴的であった。これは、酸素が豊富な環境に細菌が集まった結果、他の栄養源の供給が不足してしまった結果であると考えられる。これとは対

照的に、バルク溶液中の R2 野生株のバイオフィームでは、120 h までの時間を通して死細胞の数が極めて少ない (Fig. 3-10~Fig. 3-12 参照)。これはバルク溶液中における酸素濃度が下がっていないか、もしくは下がっていても細菌の生存に影響が出にくい可能性が考えられる。そのほか、AHL 合成遺伝子破壊株では 120 h 経過後、バルク溶液中・気液界面を問わず死細胞の数が多結果となった (Fig. 3-15 および Fig. 3-24 参照)。このことから、AHL を介した QS により活性化する遺伝子の中に、自身の生存が有利にはたらくような何らかの物質産生、もしくは機能発現にかかわるものが存在する可能性が考えられた。

バイオフィーム膜厚については、気液界面ではバルク溶液中と比較して厚い傾向があった。また、外部からあらかじめ C4-HSL を添加した条件では、培養開始後 24 h におけるバイオフィーム膜厚が最大となっており、その後徐々に減少する傾向があった。AHL 合成遺伝子破壊株を培養開始後 24 h のバイオフィームはほとんど形成されなかったため、膜厚の算出はできなかった。

表面被覆率は膜厚と一定の相関を示した (相関係数  $R = 0.7706$ , 決定係数  $R^2 = 0.5938$ , Fig. 3-29 参照)。表面被覆率が低く、膜厚が高く算出された条件では、鉛直方向に成長した一部のコロニーをバイオフィームとして検出し、膜厚として算出してしまったと考えられる (Fig. 3-14 の条件などが該当する)。逆に、膜厚が低く、表面被覆率が高く算出された条件では、表面が比較的平滑で起伏の少ないバイオフィームを解析した場合にそのような傾向が得られるものと考えられる (Fig. 3-11 の条件などが該当する)。本研究で観察されたバイオフィームの多くは一様に分布している傾向がみられたものの、各条件における表面粗さや表面性状には明らかに異なった特徴があり、本研究ではそのような視覚情報を直接的に定量化することはできなかった。*P. aeruginosa* についての既往の研究例<sup>[38]</sup>をはじめ、バイオフィームが局所的にマッシュルーム状の隆起を示すような場合は、本研究で実施したような定量化手法の相関性はより減少していくと考えられる。

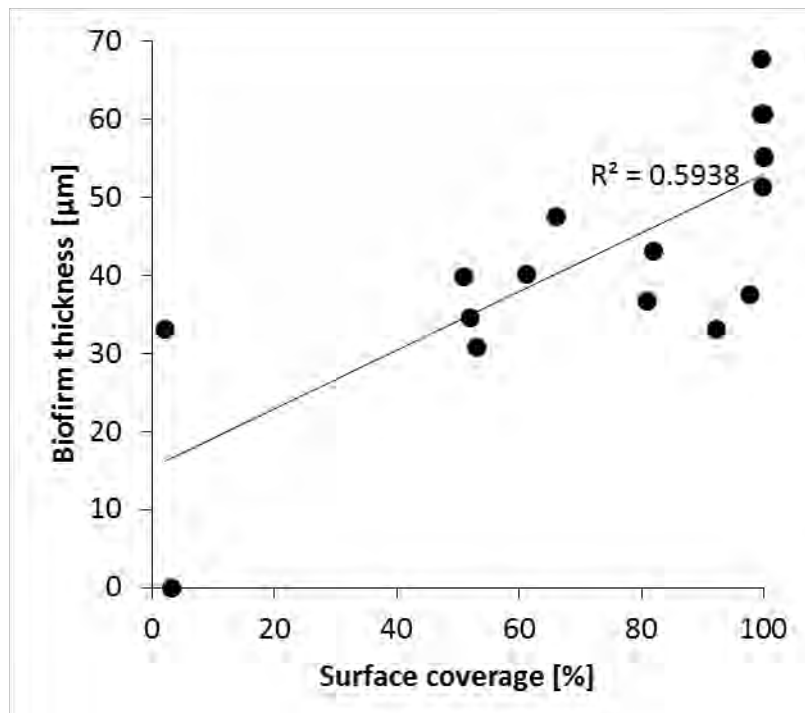


Fig. 3-29 Relationship between surface coverage and biofilm thickness

### 3.7. まとめ

本章では工場における活性汚泥処理システム中に存在する AHL 合成細菌について解析を行った。AHL 合成細菌である *A. hydrophila* R2 株のバイオフィルム形成について解析を行った結果、バイオフィルムの形成量は AHL を介した QS により制御されるほか、付着基質によっては AHL 非存在下でバイオフィルムの初期付着が進まず、バイオフィルム形成が抑制されることが示唆された。

本章の実験結果より、特にカバーガラスを用いた試験においてバイオフィルム形成過程だけでなく付着過程にも QS の影響があるように思われた。付着段階では周辺の菌体密度が高いとは考えにくく、QS 制御が関与する可能性は低いようにも思われるが、AI もしくは AI の生産に関わる遺伝子の有無により付着が制御されたとする報告はいくつか存在する<sup>[39, 40]</sup>。また、その QS 制御により発現した機能が付着基質によって効果に差が出ることもあるようだ<sup>[41]</sup>。本研究では *A. hydrophila* の QS により転写が活性化される遺伝子群の特定には至っていないため、付着やその後のバイオフィルム形成にどのような因子が関わっているのかを深く考察することはできないが、カバーガラスを用いた試験で AHL 合成遺伝子破壊株の付着が進まなかった原因のひとつとも考えられる。

## References

- [1] J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. LappinScott (1995) Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 711-745.
- [2] Parag R. Gogate (2007) Application of cavitation reactors for water disinfection: Current status and path forward. *J. Environ. Manage.* **85**: 801-815.
- [3] Mohamad Amin Saad (1992) Biofouling prevention in RO polymeric membrane systems. *Desalination* **88**: 85-105.
- [4] Monika Polanska, Koen Huysman, Chris van Keer (2005) Investigation of assimilable organic carbon (AOC) in Flemish drinking water. *Water Res.* **39**: 2259-2266.
- [5] Lynn E. Applegate and Carl W. Erckenbrecher Jr. (1987) Monitoring and control of biological activity in Permasep seawater RO plants. *Desalination* **65**: 331-359.
- [6] Susan D. Richardson (2003) Disinfection by-products and other emerging contaminants in drinking water. *TRAC-Trend Anal. Chem.* **22**:666-684.
- [7] Frederik Hammes, Sébastien Meylan, Elisabeth Salhi, Oliver Köster, Thomas Egli, and Urs von Gunten (2007) Formation of assimilable organic carbon (AOC) and specific natural organic matter (NOM) fractions during ozonation of phytoplankton. *Water Res.* **41**:1447-1454.
- [8] J. S. Baker and L. Y. Dudley (1998) Biofouling in membrane systems - A review. *Desalination* **118**:81-89.
- [9] J. S. Vrouwenvelder, F. Beyer, K. Dahmani, N. Hasan, G. Galjaard, J. C. Kruithof, and M. C. M. Van Loosdrecht (2010) Phosphate limitation to control biofouling. *Water Res.* **44**: 3454-3466.
- [10] D. Van der Kooij, W. A. M. Hijnen, and J. C. Kruithof (1989) The Effects of Ozonation, Biological Filtration and Distribution on the Concentration of Easily Assimilable Organic Carbon (AOC) in Drinking Water. *Ozone Sci. Eng.* **11**:297-311.
- [11] J. P. van der Hoek, J. A. M. H. Hofman, P. A. C. Bonne, M. M. Nederlof, and H. S. Vrouwenvelder (2000) RO treatment: selection of a pretreatment scheme based on fouling characteristics and operating conditions based on environmental impact. *Desalination* **127**:89-101.
- [12] G. K. Morse, S. W. Brett, J. A. Guy, and J. N. Lester (1998) Review: Phosphorus removal and recovery technologies. *Sci. Total Environ.* **212**: 69-81.
- [13] Christian Volk, Kimberly Bell, Eva Ibrahim, Debbie Verges, Gary Amy, and Mark LeChevallier (2000) Impact of enhanced and optimized coagulation on

removal of organic matter and its biodegradable fraction in drinking water. *Water Res.* **34**: 3247-3257.

- [14] Christopher J. Gabelich, Tae I. Yun, Bradley M. Coffey, and I. H., Mel, Suffet (2002) Effects of aluminum sulfate and ferric chloride coagulant residuals on polyamide membrane performance. *Desalination* **150**: 15-30.
- [15] Mahendra Rai, Alka Yadav, and Aniket Gade (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotech. Adv.* **27**: 76-83.
- [16] A. Dror-Ehre, A. Adin, G. Markovich, and H. Mamane (2010) Control of biofilm formation in water using molecularly capped silver nanoparticles. *Water Res.* **44**: 2601-2609.
- [17] C. Visvanathan and R. Ben Aim (1989) Application of an Electric Field for the Reduction of Particle and Colloidal Membrane Fouling in Crossflow Microfiltration. *Separ. Sci. Technol.* **24**: 383-398.
- [18] Kazuki Akamatsu, Wei Lu, Takashi Sugawara, and Shin-ichi Nakao (2010) Development of a novel fouling suppression system in membrane bioreactors using an intermittent electric field. *Water Res.* **44**: 825-830.
- [19] H.-C. Flemming (2002) Biofouling in water systems - cases, causes and countermeasures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 629-640.
- [20] El Hani Bouhabila, Roger Ben Aim, and Herve Buisson (1998) Microfiltration of activated sludge using submerged membrane with air bubbling (application to wastewater treatment). *Desalination* **118**: 315-322.
- [21] Yanghui Xiong and Yu Liu (2010) Biological control of microbial attachment: a promising alternative for mitigating membrane biofouling. *Appl. Microbiol. Biotech.* **86**: 825-837.
- [22] Guy Goldman, Jeanna Starosvetsky, and Robert Armon (2009) Inhibition of biofilm formation on UF membrane by use of specific bacteriophages. *J. Membrane Sci.* **342**: 145-152.
- [23] Nicolas Barraud, Michael V. Storey, Zoe P. Moore, Jeremy S. Webb, Scott A. Rice, and Staffan Kjelleberg (2009) Nitric oxide-mediated dispersal in single- and multi-species biofilms of clinically and industrially relevant microorganisms. *Microb. Biotechnol.* **2**: 370-378.
- [24] Sejin Kim, Sangyoun Lee, Seungkwan Hong, Youngsook Oh, Mijin Seoul, Jihyang Kweon, and Taehyun Kim (2009) Biofouling of reverse osmosis membranes: Microbial quorum sensing and fouling propensity. *Desalination* **247**: 303-315.
- [25] Kannan Ponnusamy, Diby Paul, Young Sam Kim, and Ji Hyang Kweon (2010)

- 2(5H)-furanone: A prospective strategy for biofouling-control in membrane biofilm bacteria by quorum sensing inhibition. *Braz. J. Microbiol.* **41**: 227-234.
- [26] Sajeesh Kappachery, Diby Paul, Jeyong Yoon, and Ji Hyang Kweon (2010) Vanillin, a potential agent to prevent biofouling of reverse osmosis membrane. *Biofouling* **26**: 667-672.
- [27] K. Ponnusamy, S. Kappachery, M. Thekeettle, J. H. Song, and J. H. Kweon (2013) Anti-biofouling property of vanillin on *Aeromonas hydrophila* initial biofilm on various membrane surfaces. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 1695-1703.
- [28] Leo Eberl, Søren Molin, and Michael Givskov (1999) Surface Motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* **181**: 1703-1712.
- [29] Maurizio Labbate, Shu Yeong Queck, Kai Shyang Koh, Scott A. Rice, Michael Givskov, and Staffan Kjelleberg (2004) Quorum Sensing-Controlled Biofilm Development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* **186**: 692-698.
- [30] Martin J. Lynch, Simon Swift, David F. Kirke, C. William Keevil, Christine E. R. Dodd, and Paul Williams (2002) The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environ. Microbiol.* **4**: 18-28.
- [31] Birgit Huber, Kathrin Riedel, Morten Hentzer, Arne Heydorn, Astrid Gotschlich, Michael Givskov, Søren Molin, and Leo Eberl (2001) The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiol.* **147**: 2517-2528.
- [32] Y.-S. Kang and W. Park (2010) Contribution of quorum-sensing system to hexadecane degradation and biofilm formation in *Acinetobacter* sp. strain DR1. *J. Appl. Microbiol.* **109**: 1650-1659.
- [33] S. B. Surman, J. T. Walker, D. T. Goddard, L. H. G. Morton, C. W. Keevil, W. Weaver, A. Skinner, K. Hanson, D. Caldwell, and J. Kurtz (1996) Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. *J. Microbiol. Meth.* **25**: 57-70.
- [34] Gundula Wolf, João G. Crespo, and Maria A. M. Reis (2002) Optical and spectroscopic methods for biofilm examination and monitoring. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **1**: 227-251.
- [35] Gordon D. Christensen, W. Andrew Simpson, Janara J. Younger, Larry M. Baddour, Fred F. Barrett, Dennis M. Melton, and Edwin H. Beachey (1985) Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. *J. Clin. Microbiol.* **22**: 996-1006.



- [36] Robert J. Palmer Jr. and Claus Sternberg (1999) Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches. *Curr. Opin. Biotech.* **10**: 263-268.
- [37] Yutaka Yawata, Kensuke Toda, Erika Setoyama, Junji Fukuda, Hiroaki Suzuki, Hiroo Uchiyama, and Nobuhiko Nomura (2010) Monitoring biofilm development in a microfluidic device using modified confocal reflection microscopy. *J. Biosci. Bioeng.* **110**: 377-380.
- [38] Liang Yang, Yifan Hu, Yang Liu, Jingdong Zhang, Jens Ulstrup, and Søren Molin (2011) Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Environ. Microbiol.* **13**: 1705-1717.
- [39] Maria D. Koutsoudis, Dimitrios Tsaltas, Timothy D. Minogue, Susanne B. von Bodman (2006) Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *PNAS* **103**: 5983-5988.
- [40] Cuong Vuong, Henri L. Saenz, Friedrich Götz, and Michael Otto (2000) Impact of the *agr* Quorum-Sensing System on Adherence to Polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* **182**: 1688-1693.
- [41] Maurizio Labbate, Hua Zhu, Leena Thung, Rani Bandara, Martin R. Larsen, Mark D. P. Willcox, Michael Givskov, Scott A. Rice, and Staffan Kjelleberg (2007) Quorum-Sensing Regulation of Adhesion in *Serratia marcescens* MG1 Is Surface Dependent. *J. Bacteriol.* **189**: 2702-2711.

## 第4章 アシル化ホモセリンラクトン分解細菌の解析

### 4.1. AHL 分解細菌概要

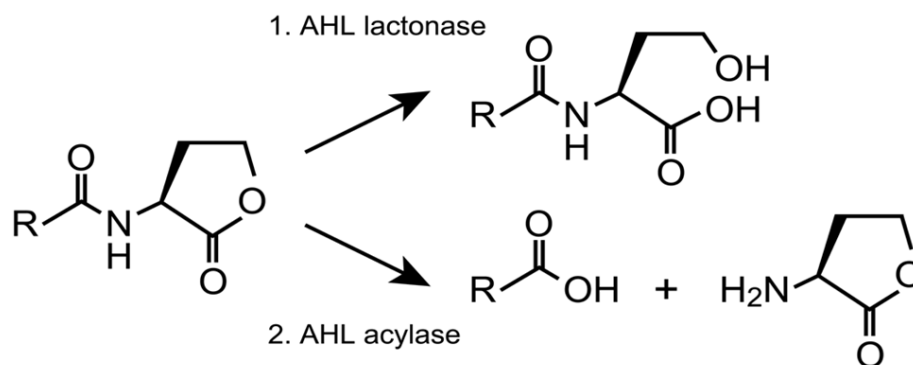
#### 4.1.1. 研究の目的

AHL を合成する能力を持つ細菌が存在するのと同様に、AHL を分解する能力を持つ細菌が存在する。これらの細菌により AHL が分解されると、AHL は QS シグナル分子としてはたらきを失う。活性汚泥中では、ある細菌について処理活性に関わる遺伝子が QS 制御されていた場合、AHL 分解細菌の存在によってその処理活性が低下する可能性がある。逆にバイオフィーム中では、バイオフィーム形成に関わる遺伝子が QS 制御されていた場合、その活性を低下させることでバイオフィーム形成が抑制される可能性がある。

第1章で述べたとおり、本研究室で活性汚泥より単離された AHL 分解細菌は大部分が *Acinetobacter* 属細菌であり、この細菌には AHL 分解細菌としての報告例が少ない。そこで本章では、まず活性汚泥中より単離された *Acinetobacter* 属細菌の AHL 分解活性を測定し、その中でも比較的分解活性の強かった細菌について AHL 分解遺伝子を探索・特定し、その分解機構および機能解析を行った。

#### 4.1.2. 既知の AHL 分解機構

既知の AHL 分解機構として、AHL のラクトン環部分を加水分解（開裂）する AHL ラクトナーゼ活性と、AHL のアミド結合部分を加水分解（切断）する AHL アシラーゼ活性が挙げられる（Fig. 4-1 参照）。いずれも加水分解反応であり、ヒドロラーゼ活性と呼ぶことがある。また、後者はアミド結合に作用することからアミダーゼと呼ぶことがある。現在までに報告されている AHL 分解細菌は、AHL 分解機構として、このいずれかの活性を持つ場合がほとんどである<sup>[1]</sup>。



**Fig. 4-1 Reactions of AHL degradation**

Two types of AHL degrading enzymes have so far been reported – AHL lactonase and AHL acylase.

#### 4.1.2.1. AHL ラクトナーゼの分解メカニズム

最初に見つかった AHL ラクトナーゼは *Bacillus* 属細菌の *aiiA* 遺伝子によってコードされる酵素で, AiiA と呼ばれる<sup>[2]</sup>. AiiA の分子構造についてはいくつか研究がなされており, その結果, 酵素に含まれる亜鉛との相互作用により反応が進行する金属酵素反応であることが分かっている.

AHL ラクトナーゼは短鎖, 長鎖両方の AHL を分解することができる反面, アシル鎖を持たないラクトン環や環状カルボン酸エステルなどの化合物に対してはほとんど, もしくは全く活性がない. この特異性の理由については分かっておらず, 今後 AHL ラクトナーゼと AHL の複合体のさらなる分子構造解析が必要である.

#### 4.1.2.2. AHL アシラーゼの分解メカニズム

AHL アシラーゼは *Ralstonia* 属細菌 XJ12B 株の AiiD<sup>[3]</sup>, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株の PvdQ<sup>[4]</sup>, *Streptomyces* 属細菌の AhlM<sup>[5]</sup>など, 様々な酵素が報告されている. これらの酵素はそれぞれ分解可能な化合物が異なり, たとえば AiiD は短鎖 AHL, 長鎖 AHL を両方分解可能だが, PvdQ はアシル鎖の炭素が 8 以下の AHL を分解することができない. また, AhlM は AHL 以外にもペニシリン G の分解が可能である. これら 3 つの酵素をコードする遺伝子配列は非常に似ているため, その分子構造も似ていると予測されているが, これらの基質特異性についても分かっていない. これらについても分子構造解析による解明が必要であるといえる.

#### 4.1.3. AHL 分解細菌の意義

AHL 合成細菌が AHL を介した QS 制御を行うことについては、細菌密度が低いときに無駄な物質生産を抑制する省エネルギーの観点から合理的である。しかし、細菌が AHL を分解する理由はよく分かっておらず、諸説考えられている。既往の研究<sup>[6]</sup>を基に、以下に理由と考えられる例を 3 つ示した。ただ、本研究室では QS およびそのシグナル物質である AHL を中心に議論を展開しているため、AHL を分解することに意味を求めがちであるが、本来は他の物質（ペニシリン G やアンピシリンなど）の分解を目的としてはたらく分解酵素が、たまたま AHL の分解酵素としてもはたらく、という可能性もあることに留意したい。

##### 4.1.3.1. AHL をエネルギー源として資化

1 つ目は細菌が AHL をエネルギー源として資化することであり、これにはいくつか報告例がある。*Variovorax paradoxus* は AHL をアシラーゼ活性により分解し、分解生成物をエネルギー源として資化する能力を持つことが報告されている<sup>[7]</sup>。なお、AHL ラクトナーゼ活性酵素 AiiA を生産することで知られている *Bacillus* 属細菌 240B1 株は、上記の *V. paradoxus* と異なり AHL の分解生成物を資化することはできないとされている<sup>[2]</sup>。

AHL をラクトナーゼ活性により分解し、エネルギー源として活用する細菌としては、*aiiA* 遺伝子のホモログを有する *Arthrobacter* 属細菌が挙げられる。AHL ラクトナーゼである AhID を生産するこの細菌は、AHL を唯一の炭素源として生育できることが報告されている<sup>[8]</sup>。

場合によっては、複数の細菌の共存によって AHL が効果的に分解される例もある。*V. paradoxus* VAI-C 株は AHL アシラーゼにより幅広い AHL を分解可能だが、分解生成物である HSL についてはほとんど資化できず、HSL が高濃度になると逆に毒性を示し生育が阻害される。一方、*Arthrobacter* 属細菌 VAI-A 株は AHL を資化することはできないが、HSL を窒素源として分解することができる（分解機構は現段階では不明である）。それぞれの細菌を、AHL を唯一の栄養源として単独で培養しようとしても増殖が進みにくいが、同条件にてこれらを共培養すると増殖が活発になる例が報告されている<sup>[9]</sup>。

上記のような生物学的な AHL 分解機構が存在しなかった場合、いかに QS に活用される AHL 濃度域が低いとはいえ、長い目で見れば環境中の AHL 総量は増加・蓄積されていくはずである。高 pH 条件や高温条件などによって AHL のラクトン環が開裂するよう

な物理化学的反応が進行する例は存在するものの、通常条件の環境下で AHL が高濃度に蓄積しているような報告例は見られないことから、AHL 分解細菌は環境中に幅広く常在し、そのうちの一部の細菌は AHL を資化する能力があると考えるのが妥当である。

#### 4.1.3.2. 他の細菌の QS を不活性化

2つ目としては、AHL 分解細菌が周辺環境中の細菌の生産する AHL を分解することでその細菌の QS を不活性化し、結果的に相手に不利な（自分たちに有利な）環境・状況をつくり上げている可能性が挙げられる。これについては、実環境中でそのような競合が行われた結果、ある菌種の QS が阻害される、もしくはある菌種の優占に寄与している等の報告はまだない。

AHL 分解細菌による QS 不活性化の一例として、*Bacillus thuringiensis* と *Erwinia cartovora* を共培養したときに、お互いの増殖を阻害することなく *E. cartovora* の病原性発現のみが抑えられたという報告がある<sup>[10]</sup>。*E. cartovora* は 3OC6-HSL を介した QS によりペクチン分解酵素を産生し、植物の細胞壁を破壊するなどの毒性を発揮する。一方、*B. thuringiensis* は AHL ラクトナーゼ活性を有し、これにより QS が阻害され、ジャガイモの腐食が抑制されたとしている。*E. cartovora* の QS 阻害による腐食抑制は、*Acinetobacter* 属細菌 GG2 株（ラクトナーゼ活性）や *Burkholderia* 属細菌 GG4 株（オキシリダクターゼ活性=3O-AHL のオキシ部を還元し 3OH-AHL を生成）、*Klebsiella* 属細菌 Se14 株（ラクトナーゼ活性）についても同様に確認されている<sup>[11]</sup>。著者らは、上記 3 種類の細菌それぞれを *P. aeruginosa* PAO1 株と液体培地中で共培養したときにエラスターゼ活性が低下することも同論文で報告している。

その他、AHL 合成細菌と AHL 分解細菌を寒天培地上でストリーキングしたときに、AHL レポーター株が応答しなくなることを示した例<sup>[12]</sup>や、AHL 分解遺伝子を AHL 合成細菌に導入した際に、AHL 分解遺伝子のはたらきにより QS が抑制されることを示した例（Table 4-1 参照）が存在する。これらは前述の共培養系と比較すると、遺伝子機能をより直接的に評価した例である。

AHL 分解細菌が他細菌の QS 不活性化を意図しているか否かについては、賛否両論が存在する。例えば、AHL ラクトナーゼである AiiA は、AHL に対して特異的に作用するが、AHL 以外の物質（アシル鎖を持たないラクトン環や、ラクトン環のないエステル類）に対してはほとんど作用しない<sup>[13]</sup>。この AHL に対する分解特異性は、QS 阻害を狙って

いることを示唆している。

一方で、*Pseudomonas aeruginosa* の LasR や RhlR は AHL のラクトン環が 2-アミノシクロペンタノンや 2-アミノシクロヘキサノールに変化しても QS シグナルレセプターとして一定の機能を示すことが分かっている<sup>[14]</sup>。つまりこれらの物質は AHL ラクトナーゼにより QS が阻害されたときの対抗策になりうる。しかし、今日までに知られている多くのグラム陰性細菌は、シグナル物質に AHL を生産していることから、そのような対抗策は今まで特に必要とせず、QS 阻害は（少なくとも深刻なレベルでは）起こっていないのではないかと考えることもできる。また近年では、ある細菌が他細菌の QS 産物による利益を享受することで繁栄するという考え方も浸透しつつあり<sup>[15]</sup>、一概に QS を阻害すればそれで自身が有利になるとも限らないであろう。

以上より、AHL 分解細菌が他の細菌の QS 阻害を目的としていることを明らかにするためには、今後さらなる調査が必要である。

#### 4.1.3.3. AHL を毒性物質とみなして分解

特定の細菌に対して AHL が毒性物質としてはたらくことがある。これを分解するために AHL 分解酵素が発達したという考え方である。これについての検討例は、現段階ではほとんど存在しないが、4.1.3.1.節でも述べたとおり、分解後の HSL が毒性物質として作用する場合もあり、AHL の毒性低減のために選択特異的にこれを分解する意義については考察が必要である。

**Table 4-1 Examples of AHL-degrading proteins and its QS inhibition**

Gene/protein	Enzymatic activity	QS strain	QS inhibition effect	References
<i>aiaA/AiiA</i>	AHL lactonase	<i>Burkholderia thailandensis</i>	reduction of swarming and twitching motility	Ulrich <sup>[16]</sup>
<i>aiaA/AiiA</i>	AHL lactonase	<i>Erwinia amylovora</i>	impairment of EPS production	Molina et al. <sup>[17]</sup>
<i>aiaA/AiiA</i>	AHL lactonase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	decrease in production of elastase, rhamnolipids, hydrogen cyanide and pyocyanin inhibition of bacterial swarming	Reimann et al. <sup>[18]</sup>
<i>attM/AttM</i> <i>aiaB/AiiB</i>	AHL lactonase	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	decrease in potato maceration	Carlier et al. <sup>[19]</sup>
<i>aiaD/AiiD</i>	AHL acylase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	decrease in swarming ability, elastase production, pyocyanin production, and nematode paralyzation	Lin et al. <sup>[3]</sup>

## 4.2. AHL 分解活性評価と調査対象菌の選定

### 4.2.1. 緒言

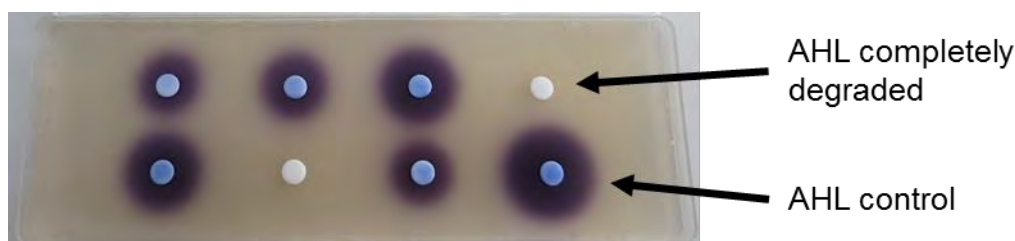
本節では、第1章 1.3.2節で実施したスクリーニングにより得られた AHL 分解細菌の分解活性評価を行った。その結果に基づき、AHL 分解活性が比較的強い菌株を調査対象菌として選定し、以降の解析を行った。

### 4.2.2. 実験方法

まず、活性汚泥より単離した各 AHL 分解細菌を 4 mL の LB 液体培地で定常期になるまで 30°C で一晩振とう培養した。これを体積比 1% で新しい LB 液体培地へ移し、さらに AHL を最終濃度 10  $\mu\text{M}$  となるように添加したものを用意し、振とう培養により AHL 分解を開始した。なお、長鎖 AHL として C10-HSL を、短鎖 AHL として C6-HSL を用いた。振とう培養開始から 3, 6, 9, 24 h 後に培養液 500  $\mu\text{L}$  を採取し、遠心分離後の上澄み液を残存 AHL 測定用サンプルとした。

残存 AHL 測定にはペーパーディスク法を用いた。角型シャーレ上に AHL レポーター株 (CV026 株もしくは VIR07 株) を混合した LB 寒天培地を用意し、その上に必要サンプル分だけペーパーディスクを並べ、各ディスク上に上記の残存 AHL 測定用サンプルを 30  $\mu\text{L}$  滴下した。これを 30°C で一晩培養後、AHL レポーター株が産生した violacein の半径を測定し、各細菌の AHL 分解量を定量した。なお、実験には AHL 分解活性を持つことで知られている *Bacillus cereus* ATCC 14579 の AHL 分解後の上澄みをポジティブコントロールとして、振とう培養の際に既知量の AHL のみを投与し、その上澄みを採取したものをネガティブコントロールとして、それぞれ用いた。

ペーパーディスク法のイメージを Fig. 4-2 に示す。ディスクに滴下されたサンプル中の AHL 残存量に応じて violacein の生産量が増加する。



**Fig. 4-2 Image of remaining AHL detection by paper disk method**

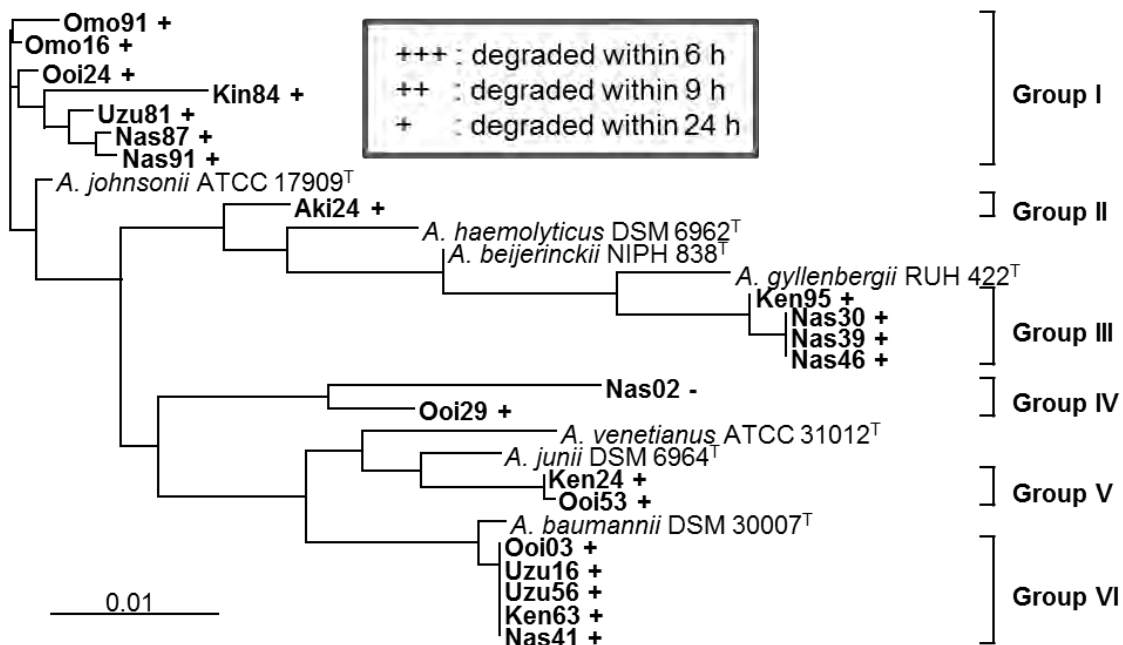
Remaining AHL in the culture supernatant is quantified by the radius of violacein spot produced by AHL reporter strain.



#### 4.2.3. 実験結果と菌の選定

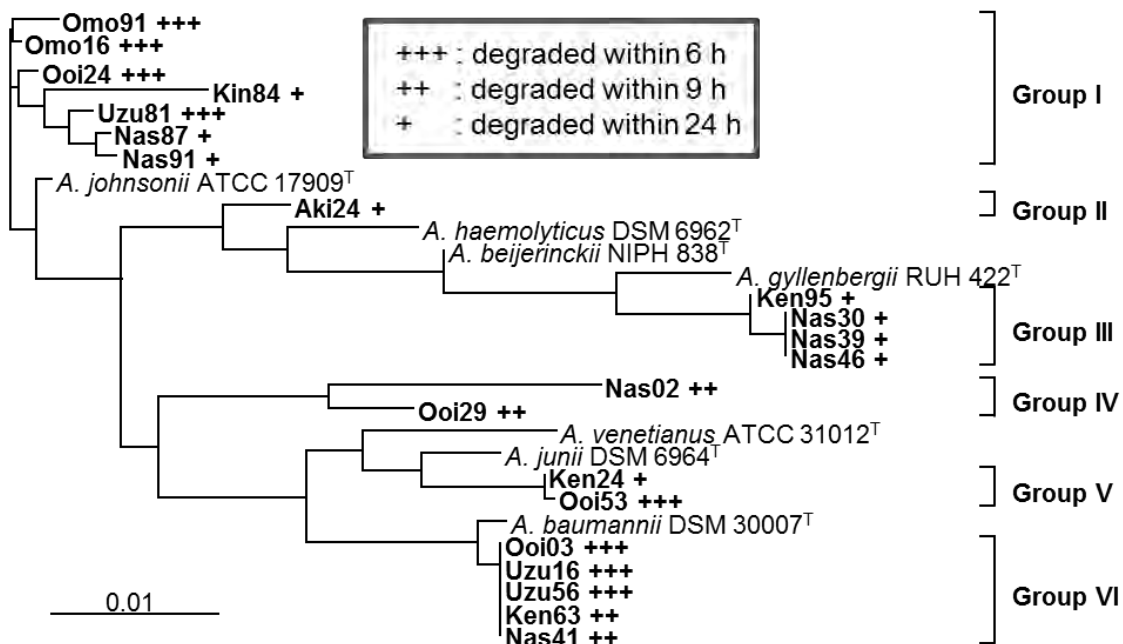
C6-HSL および C10-HSL に対する各 AHL 分解細菌の活性測定結果を Fig. 4-3 および Fig. 4-4 にそれぞれ示す。各菌株の英字 3 文字は、第 1 章 Fig. 1-4 に示したとおり、それぞれの浄化センターの頭文字であり、各浄化センター由来の菌株であることを示す。

実験結果より、各菌株は C6-HSL に対する分解活性があまり高くないことが分かった。また、C10-HSL に対して比較的高い分解活性を示す菌株は、Omo91 株、Omo16 株、Ooi24 株、Uzu81 株、Ooi53 株、Ooi03 株、Uzu16 株、Uzu56 株の 8 菌株であった。以降の節では、この中から Ooi24 株を選定し、AHL 分解機構および機能の解析を進めていくこととした。



**Fig. 4-3 C6-HSL degradability of AHL-degrading strains**

All of the tested strains exhibited relatively low degradability for C6-HSL.



**Fig. 4-4 C10-HSL degradability of AHL-degrading strains**

Some strains, especially in Group I and Group VI, exhibited relatively high degradability for C10-HSL.

### 4.3. Ooi24 株の AHL 分解機構解析

#### 4.3.1. 緒言

前述の通り、現在は 2 種類の AHL 分解機構が知られている。前節で強い AHL 分解活性を示した Ooi24 株がどちらの分解機構を有するか（もしくは、全く新しい分解機構であるか）を確認するために、まず本節で AHL ラクトナーゼ活性の有無を調査した。ラクトン環が開裂した AHL は、pH 2 以下の強酸性条件下で Fig. 4-1 の逆反応により、再び元の AHL となることが報告されている<sup>[20]</sup>。この性質を利用して、細菌が一度分解した AHL が含まれる上澄み液を強酸性とした後、中和して AHL レポーター株を用いることによって、その細菌が AHL ラクトナーゼを持っているか否かが判定できる。本節では、その調査結果を示す。

#### 4.3.2. 実験方法

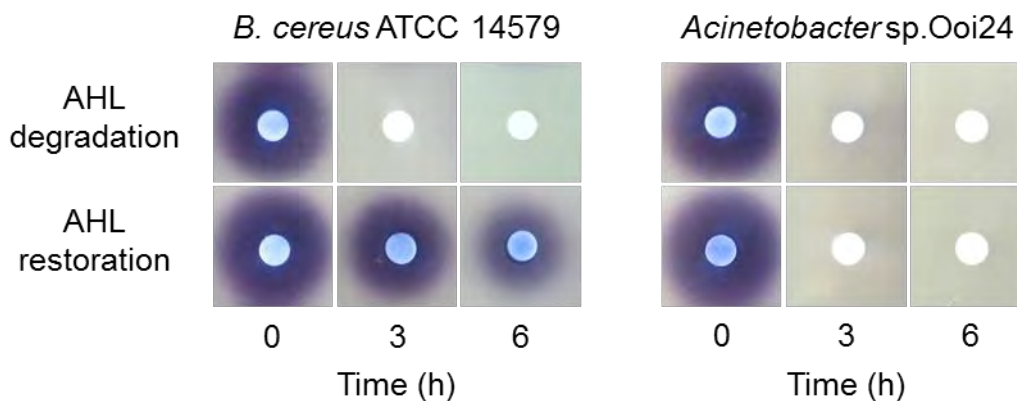
AHL の分解反応は 4.2.2 節で行った実験方法に準じた。AHL として C10-HSL を使用し、培養開始から 0, 3, 6 h 後の培養液を採取した。

得られた溶液を遠心分離し上澄みを 2 本のマイクロチューブに採取(90  $\mu$ L  $\times$  2)後、一方には 1 N HCl (10  $\mu$ L)を、他方には滅菌水(10  $\mu$ L)を加え、冷蔵放置(4°C, 48 h)した。

これらのサンプルについて、ペーパーディスク法で残存 AHL の評価を行った。方法は 4.2.2 節に記述したものと同様である。また、AHL レポーター株として VIR07 株を用い、AHL ラクトナーゼを有する *Bacillus cereus* ATCC 14579 をポジティブコントロールとして用いた点も同様である。

#### 4.3.3. 実験結果

結果を Fig. 4-5 に示す。*B. cereus* と Ooi24 株の両方について、分解試験から 3 h 経過時点で C10-HSL は完全に分解された。酸処理後には *B. cereus* によって分解された AHL は再環化していることが分かるが、Ooi24 株によって分解された AHL は分解されたままであった。このことから、Ooi24 株の AHL 分解機構は AHL ラクトナーゼによるものではないことが分かった。



**Fig. 4-5 C10-HSL restoration degraded by *B. cereus* ATCC 14579 and *Acinetobacter* sp. Ooi24**

*B. cereus* is known to degrade AHL by AHL lactonase. AHL once degraded is restored by acidification of the supernatant. Ooi24 showed no AHL restoration after acidification, indicating Ooi24 has no AHL lactonase activity.

#### 4.4. Ooi24 株の AHL 分解遺伝子スクリーニング

##### 4.4.1. 緒言

前節の結果より、Ooi24 株の AHL 分解機構がラクトナーゼではないことが分かった。しかし、現時点で 2 種類の分解機構しか知られていないとはいえ、これで Ooi24 株が AHL アシラーゼを有すると断定することはできない。そのため、次に AHL アシラーゼ活性の有無を確認する必要がある。しかし、AHL アシラーゼにより分解された生成物は、逆反応により再び AHL に戻るわけでもなく、AHL レポーター株のような高選択性・高感度のバイオセンサーで検出できる方法が確立されているわけでもない。そのため、HPLC などの機器分析が必要になってくるが、目的物質のピーク検出のためにできるだけ①不純物を抑え、②目的物質濃度を上げておきたい。①のためには、不確定要因を排除した単純な系における試験が求められる。また、②のためには、目的物質を多量に生産可能な条件が必要である。これらの理由に加え、*Acinetobacter* 属細菌の AHL 分解遺伝子に関する報告がないことから、その遺伝子配列を特定することは、その後の評価・解析に有用である。そこで本研究では、AHL アシラーゼ活性の測定に先駆けて Ooi24 株の AHL 分解遺伝子スクリーニングを実施した。本節では、その結果を報告する。

#### 4.4.2. 遺伝子ライブラリー作製

##### ① 染色体の抽出と断片化

Ooi24 株を LB 液体培地(8 mL)で前培養 (30°C, 一晚) し, 遠心分離により集菌した. これに 10:1 TE 溶液(4.5 mL)を加えボルテックス混合後, 10% SDS (500  $\mu$ L)を加え転倒混和・溶菌した. 続いてプロテイナーゼ K (50  $\mu$ L)を加え保温(37°C, 15 min)・タンパク質を分解し, フェノール・クロロホルム(4.5 mL)を加え転倒混和・タンパク質を沈殿させた. これを遠心分離し, 上澄みをビーカーに移し, イソプロパノール(~20 mL)を加えた. この溶液をピペットチップにより攪拌しながら, ピペットチップ上に染色体を巻き取った. マイクロチューブに 70%エタノール水溶液(1 mL)を用意し, 巻き取った染色体を洗浄した後, ピペットチップを室温で放置・乾燥させた.

マイクロチューブに 10:1 TE (1 mL)を用意し, その中に巻き取った染色体を分散させた. これに RNase (5  $\mu$ L)を加え放置(37°C, 30 min)・RNA を分解した後, 新しいマイクロチューブにこの処理液(200  $\mu$ L)と滅菌水(250  $\mu$ L)および 10 x M Buffer (50  $\mu$ L)を加え混合後, ブロックインキュベーター(37°C)にセットした. この状態の溶液に制限酵素 *Sau3AI* (1  $\mu$ L)を加えボルテックスすることで, 染色体の切断・断片化を開始した. 切断反応を開始後 1, 2, 3, 4, 5 min 経過後の溶液を順次分取(100  $\mu$ L)し, あらかじめ用意しておいたフェノール・クロロホルム(100  $\mu$ L)入りのマイクロチューブにそれぞれ投入し, ボルテックス混合(10 sec)により反応を停止させた. これらの溶液を遠心分離後, 上層の液を新しいマイクロチューブに移した. これに 100%エタノール(300  $\mu$ L)および 3 M 酢酸カリウム(10  $\mu$ L)を加え遠心分離後, 上澄みの液体を廃棄した. このマイクロチューブに残存したものが断片化した染色体サンプルとなる. これに 70%エタノール水溶液(500  $\mu$ L)を加え, 軽く振って洗浄して遠心分離後, 上澄みの液体をすべて捨て, チューブの蓋を開けたまま放置(RT, 30 min)・乾燥させた. その後, 10:1 TE (25  $\mu$ L)を加え, マイクロミキサーを用いて攪拌(~1 min)・染色体断片を溶解させた.

上記の断片化染色体サンプルは 1%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い, エチジウムブロマイド溶液で染色後, UV 照射下でバンドを確認した. その際, 約 3000 ~ 7000 bp の範囲に分離されたバンドをカッターナイフで切り抜き, 以降のライゲーション用サンプルとしてマイクロチューブに保存した.

##### ② 染色体断片のライゲーション

①で得られたゲルサンプルからの染色体断片の抽出には MagExtractor を用いた. まず,

切り出したゲルサンプルが入ったマイクロチューブに Binding Solution (500  $\mu\text{L}$ )を入れ、ブロックインキュベーターで加温(55°C)し、ゲルを溶解させた。これに Magnetic Beads (30  $\mu\text{L}$ )を加えボルテックス混合後、放置(RT, 2 min)した。この操作により染色体断片が Magnetic Beads に吸着される。その後、磁石スタンドを用いて Magnetic Beads を磁気分離し、マイクロチューブ内の溶液を取り除いた。これを Washing Solution (600  $\mu\text{L}$ )を加えボルテックス混合後、同様にして磁気分離し、溶液を取り除いた。さらに 75%エタノール(1 mL)を加えボルテックス混合後、同様にして磁気分離し、溶液を取り除いた。これを再度遠心分離し、アスピレーターを用いて液体を完全に取り除き、ブロックインキュベーターにより乾燥(55°C, 5 min)させた。これに滅菌水(15  $\mu\text{L}$ )を加え、マイクロピペッターを用いて中身を混合した。これにより染色体断片が Magnetic Beads から水相へと移行する。Magnetic Beads を磁気分離しつつ、水溶液を新しいマイクロチューブに移し、これにクローニングベクター pUC118 BamHI (2  $\mu\text{L}$ )と Ligation high Ver. 2 (8  $\mu\text{L}$ )を加え混合し、ブロックインキュベーターに放置(16°C, 1 h)・反応させた。

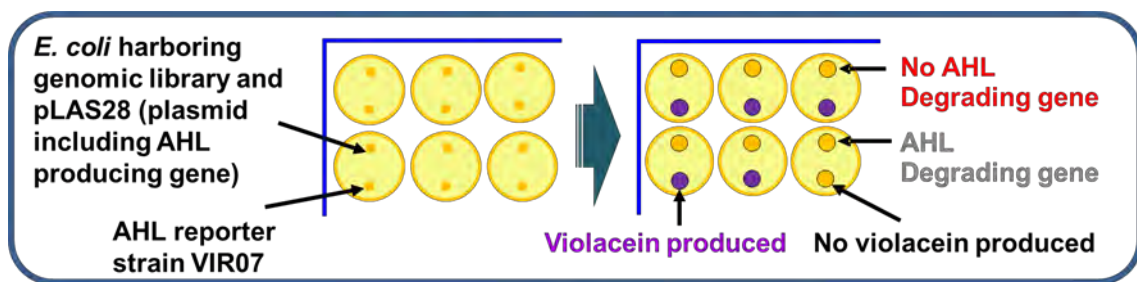
### ③ 大腸菌への形質転換とプラスミドの抽出

ディープフリーザーからコンピテントセル DH5 $\alpha$  (100  $\mu\text{L}$ )を取り出し、氷中で溶かした(5 min)。これに②で調製したライゲーション反応溶液(10  $\mu\text{L}$ )を投入し、氷中で放置(30 min)した。その後、ブロックインキュベーターを用いてヒートショック(42°C, 50 sec)を行い、LB 液体培地(900  $\mu\text{L}$ )を投入して培養(37°C, 1 h)を行った。このうち、一部(20  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$ )を LB 寒天培地 (IPTG (100  $\mu\text{M}$ ), X-gal (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), アンピシリン(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), カッコ内はいずれも最終濃度)へ接種し、一晚培養(37°C)を行った。残りの溶液(940  $\mu\text{L}$ )は2分割し、それぞれ LB 液体培地 (アンピシリン 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )へ投入して一晚培養(37°C)した。培養後の LB 寒天培地を基にブルーホワイトアッセイを実施し、十分量の染色体断片がベクターに挿入されたことを確認(4.4.5.節にて詳述)後、LB 液体培地の培養物よりプラスミドを抽出した。この抽出物を 10:1 TE 溶液(50  $\mu\text{L}$ )に溶解させ、これを Ooi24 株の遺伝子ライブラリーサンプルとした。

#### 4.4.3. AHL 分解遺伝子スクリーニング

前節で作製した pUC118 -遺伝子ライブラリープラスミド(1  $\mu\text{L}$ )と pLUX28 - AHL 合成遺伝子入りプラスミド(1  $\mu\text{L}$ )を大腸菌 DH5 $\alpha$  (25  $\mu\text{L}$ )へ形質転換し、LB 寒天培地 (IPTG (100  $\mu\text{M}$ ), X-gal (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), Amp<sup>+</sup>, Cm<sup>+</sup>)へ接種し、一晚培養(37°C)を行った。96 穴マイクロタ

イタープレート中に LB 寒天培地 (IPTG (100  $\mu$ M), Amp<sup>+</sup>, 200  $\mu$ L/well)を固めたものを用意し、先程培養してできた白コロニーを 1 つずつ各ウェルの上段に接種し、一晚培養(37°C)した。翌日、AHL レポーター株を各ウェルの下段に接種し、再度一晚培養(30°C)した。96 穴プレートを用いた操作の図解を Fig. 4-6 に示す。4.2.節の結果より、Ooi24 株は長鎖 AHL への分解活性を示すことから、AHL レポーター株には長鎖 AHL に応答して violacein を生産する *Chromobacterium violaceum* VIR07 株を用いた。翌日、violacein 生産を示さなかったものをポジティブクローンの候補としてコロニーを採取し、液体培養後プラスミドを抽出し、電気泳動にて DNA バンドを確認した。



**Fig. 4-6 Screening of AHL-degrading gene using 96-well plate**

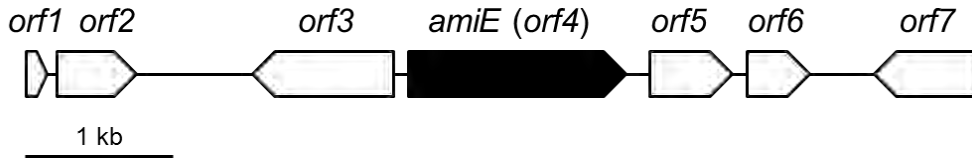
Genomic library of Ooi24 and pLAS28, which contains *lasI* from PAO1, was transformed into *E. coli*. Transformants as well as VIR07 was inoculated into LB agar medium prepared in 96-well plate as shown in the figure. AHL degrading gene may possibly be included when VIR07 exhibits no violacein production after incubation at 30°C for 24 h.

実際には、上記作業で violacein 生産を示さなかったウェル中の大腸菌は必ずしも AHL 分解遺伝子を保持しておらず、候補のコロニーをピックアップして再度 24 穴プレートなどで同様の試験を実施したときや、ペーパーディスク法による確認を実施したときには violacein が生産されるものもあった。これにはいくつか理由が考えられ、どちらかの菌体がうまく接種されていなかった可能性や pLUX28 中の AHL 合成遺伝子の発現が不安定だった可能性などが挙げられるが、はっきりとした原因は分かっていない。

およそ 10,000 クローンについて、上記のスクリーニング作業および確認作業を実施した結果、1 つのポジティブクローンを取得することができたため、これについてシーケンサーによる解析を行った。その結果を次節で示す。

#### 4.4.4. シーケンスの結果

シーケンスの結果をもとに、得られたオープンリーディングフレーム(Open Reading Frame, ORF)の模式図を Fig. 4-7 に示す.



**Fig. 4-7 Arrangement of predicted ORFs on the AHL-degradative clone**

Seven ORFs were identified from the gene fragment of AHL-degradative clone. Filled arrow was identified as *amiE* gene, which showed similarities to amidase. The incomplete ORFs, *orf1* and *orf7*, showed similarities to endoribonuclease and single-stranded DNA-specific exonuclease, respectively. Complete ORFs, *orf2* and *orf3*, showed similarities to FMN reductase and an AraC-family transcriptional regulator, respectively. Complete ORFs, *orf5* and *orf6*, were predicted to encode an IS4-family transposase.

取得した遺伝子断片からは、両端に部分的な配列を持つ2つのORF (*orf1*, *orf7*)と、その内側に全配列を含んだ5つのORF (*orf2*~*orf5*)、計7つのORFを特定できた。このうち、*orf1* はエンドリボヌクラーゼ、*orf7* は一本鎖 DNA に特異的に作用するエキソヌクラーゼと推定された。また、*orf2*, *orf3*, *orf4* はそれぞれ FMN レダクターゼ、AraC ファミリーの転写制御因子、アミダーゼであると推定された。*orf5* および *orf6* は IS4 ファミリーのトランスポザーゼをコードしていると推定された。このうち、4つ目のORF は脂肪族アミダーゼ相同遺伝子 *amiE* であり、ヒドロラーゼ活性を有する。そこで、*amiE* の AHL 分解活性を確認するために、上記の遺伝子断片から *amiE* のみを増幅してクローニングを行い、分解活性の評価を行った。

取得した遺伝子断片について、*amiE* を含む配列をカバーしたプライマー：5'-TAC TTG TTC GC AAT GTG TGA TGG CAC GC-3'および5'-CCA CGT TTA TTG AGC AAT GTC CAA ACAATG GG-3'を用意し、PCR で増幅した。電気泳動で目的の DNA バンドを分離した後、これをライゲーションにより pGEM-T に組み込み、コンピテントセル DH5 $\alpha$  へ形質転換し



た。培地上の白コロニーを6個、青コロニーを2個（pGEM-Tがセルフライゲーションしたもの）を選択し、これをLB液体培地で前培養し、新しいLB液体培地(4 mL)に接種(40  $\mu$ L)後、C10-HSL (10  $\mu$ M)およびアンピシリン(100  $\mu$ g/mL)を添加して振とう培養(37°C)を行った。遠心分離後の上澄みについてペーパーディスク法を実施し、C10-HSLの分解活性を評価した。その結果、すべての白コロニーサンプルについてC10-HSL分解活性を示した。さらに、遠心分離した培養物からプラスミドを抽出し、制限酵素 *SphI* で切断したものを電気泳動で確認したところ、6個のサンプルのうち1個は *amiE* が逆向きに挿入されていることが分かった。このことから、*amiE* のAHL分解活性はその配列の向きに依存せず発現することが分かった。

#### 4.4.5. 補足 ～ブルーホワイトアッセイ～

本研究ではOoi24株の遺伝子ライブラリー作製にあたり、十分量の染色体断片がプラスミドベクターに挿入されたか判定するためにブルーホワイトアッセイを行った。これは、本実験で用いたベクターpUC118がセルフライゲーションをして大腸菌に組み込まれた際にラクトースオペロンが発現し、X-galが分解されて青色色素を産生することを利用して、具体的には、ラクトースオペロンを構成する *lacZ* 遺伝子がコードする $\beta$ -ガラクトシダーゼによりX-galがガラクトースと5-ブロモ-4-クロロ-3-インドールに分解され、この分解生成物のうち後者が不溶性の青色色素である5,5-ジブロモ-4,4-ジクロロ-インディゴに変化する。この性質を利用し、コロニーが青色に染まった場合は、プラスミドベクターに染色体断片が挿入されていないことが確認できる。白コロニーとの割合を比較することで、形質転換の効率の良し悪しを判定することもできる。

本実験では形質転換後の溶液(1010  $\mu$ L)より20  $\mu$ Lおよび50  $\mu$ LをそれぞれLB寒天培地に接種後、一晚培養したものについて、青白コロニーカウントを行った。その結果をTable 4-2に示す。

**Table 4-2 Number of colonies detected in the blue-white assay**

	dose [ $\mu$ L]	total		dose [ $\mu$ L]	blue	white
		blue	white			
sample 1	20	1	42	70	4	120
	50	3	78			
sample 2	20	1	48	70	10	154
	50	9	106			
sample 3	20	1	6	70	30	63
	50	29	57			
sample 4	20	5	3	70	20	27
	50	15	24			

このうち、最も白コロニー数の多かった sample 2 について考える。白コロニーは 70  $\mu$ L 接種した中で計 154 個であったため、溶液 1  $\mu$ L あたり  $154 \div 70 = 2.2$  個の白コロニー生成が期待できる。形質転換後の溶液のうち、LB 液体培地による培養に回したのは 940  $\mu$ L であるため、 $940 \mu\text{L} \times 2.2 \text{ 個} = 2,068$  個の白コロニー生成、つまり、最大 2,000 種類以上の染色体断片を保有したプラスミドの存在が期待できる。ここで、各染色体断片の大きさの平均値を 5,000 bp と仮定すると、 $2,000 \text{ 個} \times 5,000 \text{ bp} = 10,000,000 \text{ bp} = 10 \text{ Mbp}$  分の染色体断片が抽出できたと見積もることができる。一般的な細菌のゲノムサイズは約 5 Mbp 前後であるため、sample 2 に関しては Ooi24 株の全ゲノムをカバーするだけの染色体断片が抽出できていることが期待される。一方、同様の計算を sample 4 について実施すると、抽出された染色体断片の総量は約 1.8 Mbp となり、細菌のゲノムサイズに満たないため、目的の遺伝子領域が含まれる可能性はかなり低いといえる。

LB 液体培地で培養した溶液から抽出したプラスミドをサンプルとして電気泳動にかけてバンドを確認した結果、LB 寒天培地上のコロニー数と DNA バンドの濃度はおおむね比例する傾向にあった。他と比較して sample 1 については濃い DNA バンドが検出され、遺伝子ライブラリーとして良好であることが分かった。

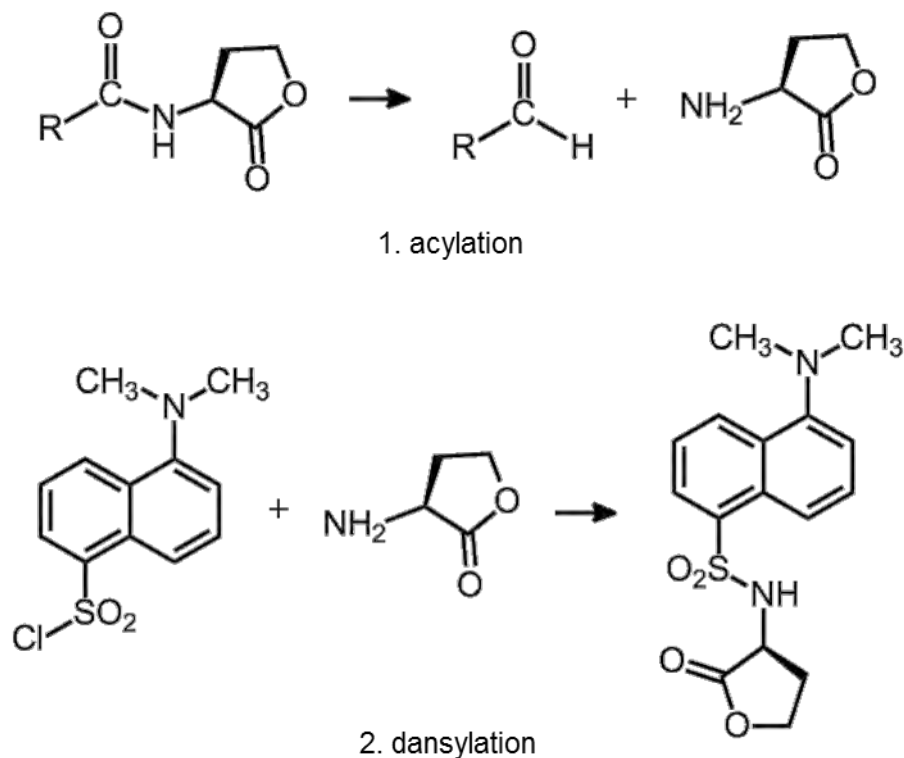
## 4.5. AmiE の AHL 分解機構解析

### 4.5.1. 緒言

前節で Ooi24 株の AHL 分解遺伝子スクリーニングを実施し, AHL 分解遺伝子 *amiE* を特定することができた. 本節では, AmiE の AHL アシラーゼ活性調査を行う.

AHL アシラーゼ活性調査では, AmiE により AHL を分解させた後の溶液にダンシルクロリドを加えて反応を試みる. 仮に AmiE が AHL アシラーゼ活性を有していた場合, AHL の分解によってホモセリンラクトン(HSL)が生成する. これをダンシルクロリドと反応させ, その反応生成物が HPLC で検出できることを利用する. ピークが検出されなかった場合は, 溶液中に HSL が存在せず, AHL アシラーゼによる分解ではないと考えられる.

以上の反応式を Fig. 4-8 に示す. 反応式”2. dansylation”の生成物を HPLC で検出する.



**Fig. 4-8 Scheme of AHL acylation and the following dansylation**

Homoserine lactone (HSL) is produced by the acylation of AHL. Dansyl chloride reacts with HSL in the following dansylation, and the product is detected by HPLC analysis.

#### 4.5.2. 実験方法

##### ① *amiE* のクローニング

*amiE* が挿入されたプラスミドとして、4.4.4節の試験で得られた *amiE* - pGEM-T のうち、T7 プロモーター順方向に挿入されたものを用いた（これは LacZ から見ると逆方向である）。また、同様の試験で得られた空ベクター（pGEM-T がセルフライゲーションしたもの）をコントロールとして用いた。これをコンピテントセル BL21 に形質転換した。

##### ② AHL 分解反応

形質転換後のコロニーを LB 液体培地(4 mL × 2, Amp<sup>+</sup>)で培養(37°C, 7 h)し、このうち 40 μL を新しい LB 液体培地(4 mL × 2, IPTG (1 mM), Amp<sup>+</sup>)へ接種して一晩培養(37°C)した。これをプラスチックチューブに移し、遠心分離後、上澄みは廃棄してリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate Buffered Saline, PBS) (4 mL × 2)を加えた。ボルテックス混合により洗浄し、遠心分離後、再度上澄みは廃棄して PBS (4 mL × 2)を加えた。これをボルテックス混合したものを 6 本のスクリーチューブへ分注(1 mL/本)し、各チューブに Table 4-3 に示す量の物質を添加して振とう培養(30°C, 6 h)を実施した。

##### ③ ダンシル化反応と HPLC 分析

AHL 分解反応後の溶液は遠心分離し、上澄みを採取(150 μL)した。これに飽和ホウ砂溶液(150 μL)を加え、さらにダンシルクロリド・アセトン溶液(初期濃度 4 mg/mL, 300 μL)を加えた。これをボルテックス混合後、ブロックインキュベーターで反応(40°C, 60 min)させた。反応後の溶液を HPLC で分析した。HPLC 分析条件については Table 4-4 に示した。

#### 4.5.3. 実験結果と考察

HPLC による分析結果を Fig. 4-9 および Fig. 4-10 に示す。Fig. 4-9 は大腸菌 BL21 に pGEM-T を導入したときの結果であり、Fig. 4-10 は pGEM-*amiE* を導入したときの結果である。AHL の代わりに HSL 標準物質を添加したサンプルでは、Fig. 4-8 のダンシル化反応が進行し、保持時間 6.56 min に反応生成物のピークが検出された。また、溶媒(DMSO)のみを添加したサンプルではピークが検出されなかった。

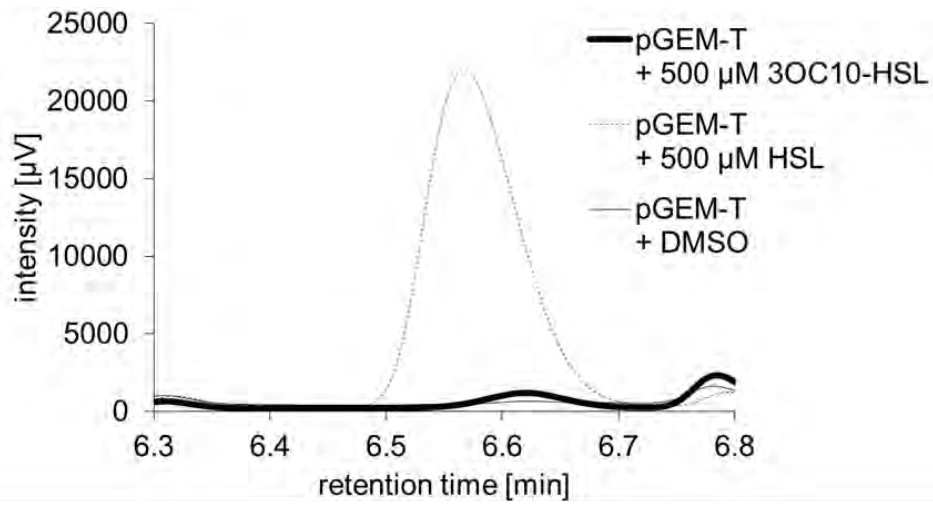
3OC10-HSL を添加して AHL 分解反応を実施したサンプルでは、大腸菌に pGEM-T のみを導入した場合はピークが検出されなかったのに対し、pGEM-*amiE* を導入した場合はダンシル化反応生成物を示すピークが検出された。これは *AmiE* が AHL アシラーゼとして機能したことを示す。以上より、*AmiE* は AHL アシラーゼ活性を有していることが分かった。

**Table 4-3 Substances added to the PBS-washed Ooi24 prepared for AHL acylase activity investigation**

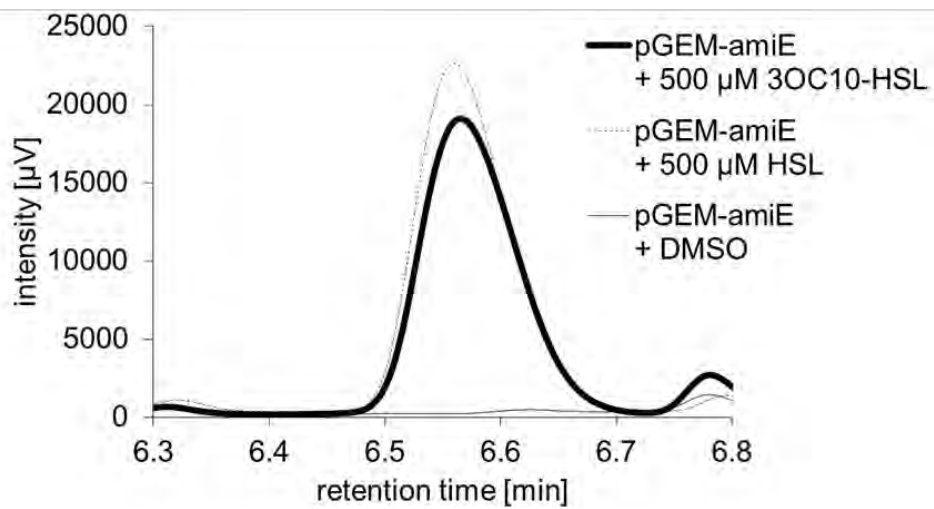
plasmid		added substance		
		3OC10-HSL (DMSO)	HSL (DMSO)	- (DMSO)
pGEM-amiE	amount [ $\mu$ L]	5	5	5
	final conc. [ $\mu$ M]	500	500	-
pGEM-T easy	amount [ $\mu$ L]	5	5	5
	final conc. [ $\mu$ M]	500	500	-

**Table 4-4 Analytical conditions of HPLC for detection of dansylated product**

Instrument	HPLC 2000 series (Jasco, Tokyo, Japan)
Column	Mightysil RP-18GP column 4.6 mm x 250 mm (5 $\mu$ m)
Mobile phase	H <sub>2</sub> O : CH <sub>3</sub> CN : CH <sub>3</sub> COOH = 75 : 25 : 0.05 (v/v/v) CH <sub>3</sub> CN 0% (0 ~ 2.5 min), 0 ~ 100% (2.5 ~ 7.5 min), 100% (7.5 ~ 10 min)
Flow rate	2.0 mL/min
Injection volume	20 $\mu$ L
Column temperature	at room temperature
Detector	UV-visible detector 270 nm



**Fig. 4-9 HPLC analysis of dansylated product from culture supernatant of pGEM-T harboring *E. coli***



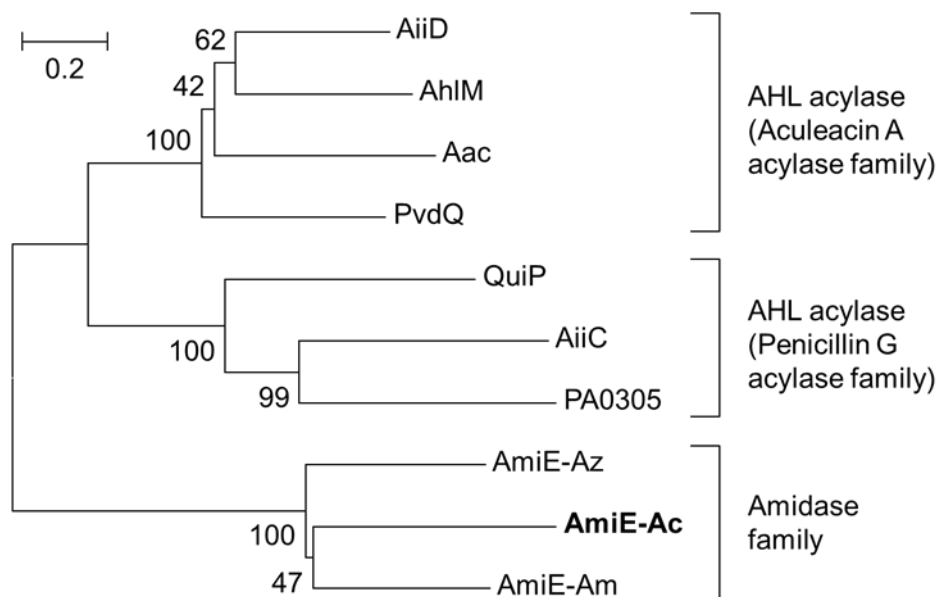
**Fig. 4-10 HPLC analysis of dansylated product from culture supernatant of pGEM-amiE harboring *E. coli***

## 4.6. 系統解析

### 4.6.1. AmiE の系統解析

前節の結果より、AmiE が AHL アシラーゼであることが分かった。ここでは AmiE および既知の AHL アシラーゼをいくつか選定し、アミノ酸配列に基づいた系統樹を作成した。系統樹は近隣結合法に基づき、Clustal W program of the MEGA (version 6) package を用いて作成した。既知の AHL アシラーゼとして *Ralstonia* sp. XJ12B 株の AiiD<sup>[3]</sup>, *Streptomyces* sp. M664 株の AhIM<sup>[5]</sup>, *P. aeruginosa* PAO1 株の PvdQ<sup>[21]</sup>, *Shewanella* sp. MIB015 株の Aac<sup>[22]</sup>, *P. aeruginosa* PAO1 株の PA0305<sup>[23]</sup>, *Anabaena* sp. PCC7120 株の AiiC<sup>[24]</sup> および *P. aeruginosa* PAO1 株の QuiP<sup>[25]</sup> を対象とした。また、既知の AmiE 相同タンパク質として、*Azospirillum* sp. B510 (AmiE-Az) および *Amycolatopsis orientalis* HCCB 10007 (AmiE-Am) を対象とした。作成した系統樹を Fig. 4-11 に示す。

AmiE は既知の AHL アシラーゼ (Aculeacin A acylase family および Penicillin G acylase family) と近縁であるが、これまでに AHL 分解酵素としての報告がないサブファミリー (アミダーゼファミリー) に属することが分かった。



**Fig. 4-11 Phylogenetic tree of AHL acylases based on the amino acid sequences**

Phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method with the Clustal W program of the MEGA (version 6) package. Amino acid sequences of AiiD, AhIM, PvdQ, Aac, PA0305, AiiC, QuiP, and AmiE, from this study, were applied as known AHL acylase. In addition, homologues of AmiE from *Azospirillum* sp. strain B510 and *Amycolatopsis orientalis* HCCB10007 were also selected for analysis.

#### 4.6.2. *Acinetobacter* 属細菌の 16S rRNA 系統解析

全ゲノムが判明している *Acinetobacter* 属細菌を対象に, *amiE* 相同遺伝子を有するものを探索したところ, Ooi24 株以外の 2 種類の細菌について *amiE* 相同遺伝子が確認された. これらの細菌の近縁性について確認するため, 他の *Acinetobacter* 属細菌のうち全ゲノムが判明している 8 種を含めた計 11 種の *Acinetobacter* 属細菌について, 近隣結合法により 16S rRNA 系統解析を実施した. その結果を Fig. 4-12 に示す.

カッコ内の文字列は DNA データベース(DDBJ/EMBL/Genbank)のアクセッション番号を示す. また, *amiE* 相同遺伝子を持つ菌株については太字で示した. この結果より, *amiE* を有する菌株同士の近縁性は薄く, *Acinetobacter* 属細菌に広く保存された配列ではないことが確認された. さらに, *amiE* を有する 3 種の菌株について, *amiE* の上流および下流の配列を比較した. それぞれの ORF を模式化した結果を Fig. 4-13 に示す.

黒塗りの矢印は *amiE* を示す. 灰色の矢印は保存された遺伝子, 線入りの矢印はトランスポゾン性の遺伝子をそれぞれ示す. 保存性の高い遺伝子領域における塩基配列の相違はほとんどなく (2 塩基以下), その周囲にトランスポゾン性の遺伝子が点在していた. さらに, AmiE のアミノ酸配列は他の *Acinetobacter* 属細菌のアミダーゼファミリータンパク質との類似性はなく,  $\gamma$ -プロテオバクテリア門に属する *Thalassolituus oleivorans* MIL-1 株 (M5E2I7) および *Marinobacter algicola* DG893 株 (A6F504) のアミダーゼとそれぞれ 46.0% および 39.9% の一致率を示した. これらのことから, Ooi24 株の *amiE* 遺伝子はトランスポゾンによって外部から転移してきた可能性が高いと考えられる.



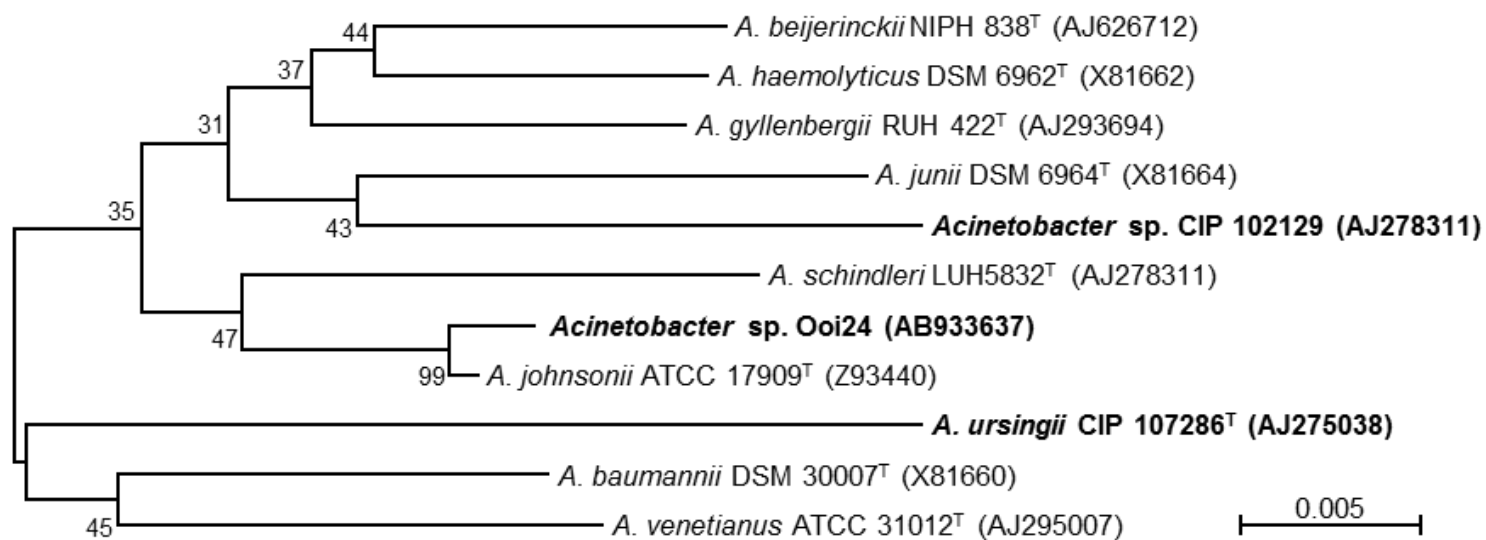


Fig. 4-12 Neighbor-joining trees of the 16S rRNA gene sequences obtained for *Acinetobacter* strains

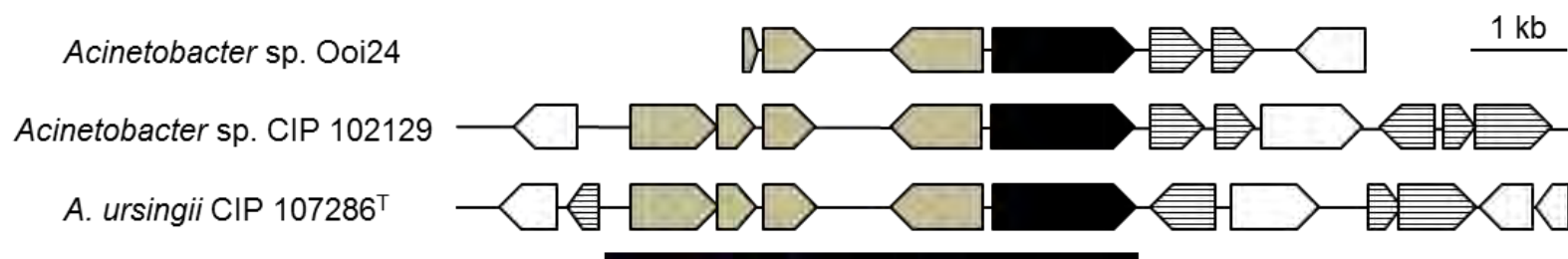


Fig. 4-13 Arrangement of predicted ORFs in the upstream and downstream regions of *amiE* genes in the genome of *amiE*-possessing *Acinetobacter* strains

#### 4.6.3. 補足 ～トランスポゾンについて～

トランスポゾンとは、染色体やプラスミド間、もしくは内部で転移する特徴的な構造をもつ DNA 断片の遺伝単位である。転移遺伝因子（動く遺伝子）と呼ばれ、非常に特異な配列を持ち、遺伝子内に組み込まれたトランスポザナーゼにより、細菌間、細菌-真核生物間、細菌-動物間などの生物圏をかなり自由に動き回ることができると考えられている。この移動現象のことを一般に遺伝子水平伝播(Horizontal Gene Transfer, HGT or Lateral Gene Transfer, LGT)と呼び、トランスポゾン以外にもプラスミドやバクテリオファージなどもこの移動現象に寄与している<sup>[26]</sup>。

トランスポゾンが染色体やプラスミドの他の場所へ移動することによって、種々の遺伝的变化を生じる。ある遺伝子の間にトランスポゾンが挿入されることにより、その遺伝子の活性が失われたり変調をきたしたり、染色体の一部が失われたりする<sup>[27]</sup>。このような遺伝子の配置転換とそれに伴う形質の変化は生物の進化に重要な役割を果たしていると考えられる。自然界における形質転換がどの程度の頻度で発生しているかは定かではないが、定期的に起こっているものと考えられており<sup>[27]</sup>、本研究で解析を行った *amiE* 遺伝子も外部から転移してきたものである可能性が高い。

## 4.7. AmiE の各種 AHL に対する分解活性

### 4.7.1. 緒言と実験方法

前節では C10-HSL を用いて AmiE が AHL アシラーゼであることを確認した。本節では、種々の鎖長・側鎖の AHL に対する AmiE の AHL 分解活性を評価することを目的とする。

実験としては、AHL 分解試験までは 4.5.2.節の①, ②と同様の操作を行った。ただし、添加する AHL の種類・添加量・最終濃度および AHL 分解反応時間は Table 4-5 のようにした。また、4.5.2.節でコントロールとして用いた、AHL 分解遺伝子なしの大腸菌は、本実験では用いていない。

**Table 4-5 Experimental conditions for various AHL degradation by AmiE**

added substance	amount [μL]	final conc. [μM]	sampling time [min]
C6-HSL			0, 150, 300, 450
C8-HSL	2	20	0, 150, 300, 450
C10-HSL			0, 30, 60
C12-HSL			0, 30, 60, 90
3OC6-HSL			
3OC8-HSL	2	20	0, 150, 300, 450
3OC10-HSL			
3OC12-HSL			

### 4.7.2. 実験結果

C6-HSL ~ C12-HSL に対する AmiE の分解活性の結果を Fig. 4-14 に、それらの 3-oxo 体に対する分解活性の結果を Fig. 4-15 に示す。AmiE は C10-HSL および C12-HSL に対しては強い分解活性を示し、90 min 以内にほぼ分解した。一方、C8-HSL の分解には一定の時間を要し、C6-HSL については全く分解しなかった。また、3-oxo 体の AHL についてはより分解に時間がかかる結果となり、3OC6-HSL および 3OC8-HSL については全く分解しなかった。このことから、AmiE は長鎖 AHL に対して強い分解活性を有することが確認された。これは 4.2.3.節で得られた AHL 分解活性の結果と同様の傾向であるといえる。また、既知の AHL アシラーゼである Aac, PvdQ, AhlM, QuiP とも同様の傾向である<sup>[28]</sup>。

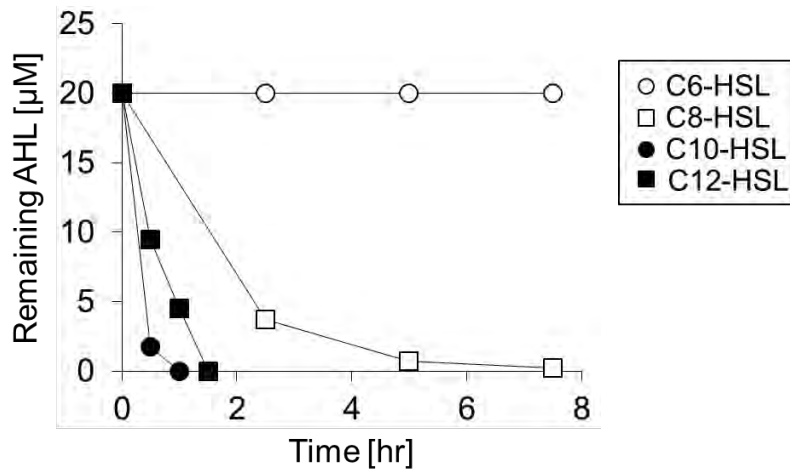


Fig. 4-14 Degradation rate of AHLs by AmiE

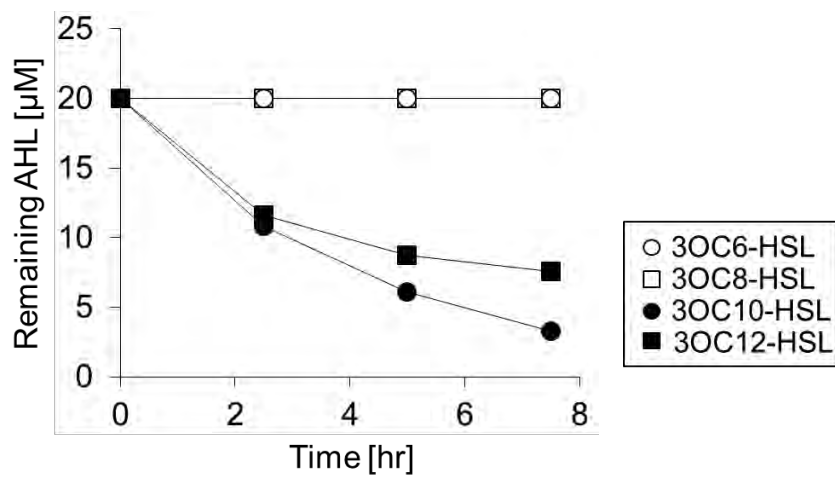


Fig. 4-15 Degradation rate of 3-oxo-AHLs by AmiE

## 4.8. *P. aeruginosa* のエラスターゼ活性への AmiE の影響

### 4.8.1. 緒言と実験方法

本節では, AHL 合成細菌に *amiE* 遺伝子を導入したときの, AmiE の AHL 分解による QQ (Quorum Quenching) の確認を行った. QQ 用のモデル細菌として *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株を選定した. *P. aeruginosa* は LasI および RhII を介して, それぞれ 3OC12-HSL および C4-HSL を QS シグナル物質として合成しており, このうち 3OC12-HSL を介した QS によって, 病原性にかかわるエラスターゼ活性を制御している<sup>[29]</sup>. そこで, 本節では *amiE* を組み込んだプラスミドを有する *P. aeruginosa* のエラスターゼ活性を確認することで, AmiE が細菌内で生産された AHL を分解し QQ を示すかどうか確認を行った.

#### ① pBBR1-*amiE* プラスミドの作製

まず, Ooi24 株の染色体から *amiE* 配列を増幅させた. プライマーには 5'-TCT AAG CTT CCG ATC ATG AGC TTC AAT ATT GCA CC-3' および 5'-TCT GGA TCC TCG TCA ATC AAT TGA TTT CTA GTC GG-3' を用いた. なお, 下線部に *Hind*III および *Bam*HI の制限酵素認識部位を設けた. DNA ポリメラーゼには Blend Taq を用い, PCR を実施した. PCR 産物は *Hind*III および *Bam*HI による制限酵素処理を実施後, 同じ制限酵素処理を実施したベクター-pBBR1MCS5 へライゲーションし, pBBR1-*amiE* を作製した.

なお, ポジティブコントロールとして, *Solibacillus silvestris* StLB046 株由来の AHL ラクトナーゼ遺伝子 *ahsS* を選定し, pBBR1-*ahsS* を作製した<sup>[30]</sup>. また, ネガティブコントロールとして, pBBR1MCS5 を用いた.

#### ② *P. aeruginosa* PAO1 株への導入

pBBR1MCS5, pBBR1-*ahsS*, pBBR1-*amiE* それぞれの *P. aeruginosa* PAO1 株への導入はエレクトロポレーションにより行った<sup>[31]</sup>. まず, *P. aeruginosa* を LB 液体培地(4 mL)で培養し, 坂口フラスコに用意した LB 液体培地(100 mL)で本培養を行った. OD<sub>600</sub> の値が 0.4 前後になったところで, これを分取(40 mL)し遠心分離後, 上清を除去した. これに 300 mM スクロース水溶液(40 mL)を加えてボルテックス後, 再び遠心分離し, 上清を除去した. さらに同スクロース水溶液を 20 mL 加え, 同様の操作を行った. 得られた沈殿物に同スクロース水溶液 600 μL を加え, ボルテックス後, これを 100 μL ずつ分取し, それぞれに pBBR1MCS5, pBBR1-*ahsS*, pBBR1-*amiE* のプラスミド溶液 2 μL を加えた. これを電極間隔 2 mm のエレクトロキューベットに入れ, パルス電流を流した. 直後にこの溶液をマイクロチューブに移し, LB 液体培地(900 μL)を加えてインキュベーター中で放置した(30°C, ~24

h). これを LB 寒天培地 (ゲンタマイシン 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) にて培養し, 生育したコロニーをプラスミド導入後の PAO1 株として採取した.

### ③ エラスターゼ活性試験

プラスミド導入後の PAO1 株を LB 液体培地で前培養し, 新しい LB 液体培地へ 1%濃度で接種した. これに IPTG(1 mM)を加え, 15 h の振とう培養を行った. 培養物の OD<sub>600</sub> を測定後, 遠心分離し, 上澄みを採取(600  $\mu\text{L}$ )した.

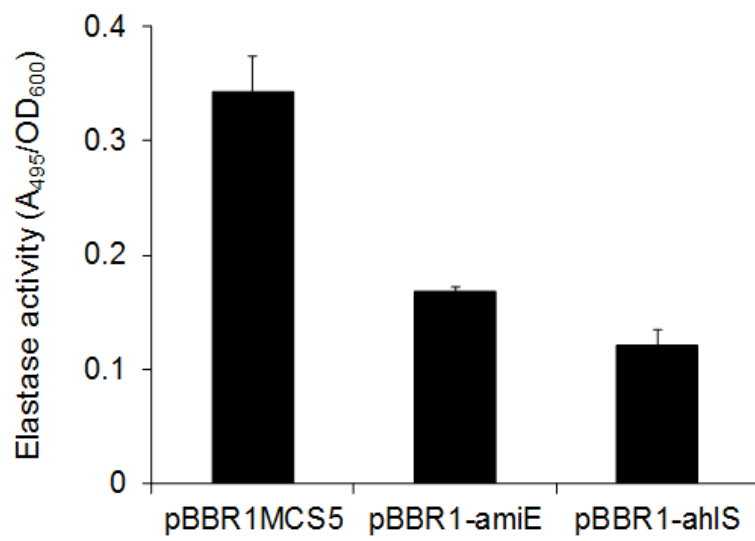
ここから AHL を抽出するため, 等量の酢酸エチル(600  $\mu\text{L}$ )を加え, 10 min のボルテックス混合を行った. 水相は廃棄し, 残った酢酸エチルを減圧下で蒸発させ, 残留物を DMSO(100  $\mu\text{L}$ )に溶解させた.

エラスターゼ活性は上記の上澄みをサンプルとしてエラスチンコンゴレッド(Elastin Congo Red, ECR)アッセイによって評価した<sup>[23]</sup>. まず, 上澄み(100  $\mu\text{L}$ )に ECR (20 mg)および ECR バッファ(100 mM Tris, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5, 900  $\mu\text{L}$ )を加え, 振とう培養を行った(4 h). その後, 溶けずに残留した ECR を遠心分離で沈殿させ, 波長 495 nm における上澄みの吸光度を測定した. 得られた値を OD<sub>600</sub> の値で除してエラスターゼ活性を算出した.

## 4.8.2. 実験結果

エラスターゼ活性の測定結果を Fig. 4-16 に示す. 実験は n=3 で実施し, その標準偏差をグラフ上にエラーバーで示した. pBBR1MCS5 ベクターを導入した PAO1 株と比較して, pBBR1-amiE を導入した株は pBBR1-ahlS を導入した株とともに, エラスターゼ活性が 50% 以上低下した.

抽出した AHL を確認した結果, pBBR1MCS5 ベクターを導入した PAO1 株の上澄みからは, *P. aeruginosa* が生産する 3OC12-HSL および C4-HSL の両方が検出されたが, 他の 2 つのサンプルからはいずれも検出されなかった. AmiE に関しては C4-HSL の分解活性がないにもかかわらず C4-HSL も検出されなかったが, これは C4-HSL を生産するための *rhl* 系 QS が, 3OC12-HSL 存在下で活性化する *lasR* 遺伝子により制御されている<sup>[32]</sup>ためであると考えられる. 過去の研究における AHL アシラーゼ PA0305 についても 50%以上のエラスターゼ活性低下を示すと同時に, AmiE と同様の分解特性をもちながら C4-HSL は検出されなかったと報告されている<sup>[23]</sup>.



**Fig. 4-16** Elastase activities in the culture supernatant of PAO1 harboring AHL-degrading gene

#### 4.9. まとめ

本章では、活性汚泥構成細菌よりスクリーニングを行った AHL 分解細菌のうち、AHL 分解活性が比較的大きい *Acinetobacter* 属細菌 Ooi24 株について分解機構解析を実施した。まず、既知の AHL 分解機構のうち、AHL ラクトナーゼ活性の有無について確認を行い、Ooi24 株の AHL 分解機構が AHL ラクトナーゼによるものではないことを明らかにした。次に、AHL アシラーゼ活性の確認を行うため、Ooi24 株より AHL 分解遺伝子を取得することとした。作製した Ooi24 株の遺伝子ライブラリーの中から、AHL 分解遺伝子のスクリーニングを行い、AHL 分解活性を有する遺伝子 *amiE* を特定した。これについてさらに解析を行った結果、AmiE が AHL アシラーゼ活性を有し、PvdQ など既知の AHL アシラーゼと類似した分解活性を示すことが分かった。しかし、AmiE はこれらの AHL アシラーゼと近縁であるが、異なるサブファミリーであるアミダーゼファミリーに属することが分かった。*P. aeruginosa* PAO1 株に *amiE* 遺伝子を導入することで、エラスターゼ活性が抑えられることを確認した。16S rRNA に基づいた系統解析により、*amiE* 遺伝子は *Acinetobacter* 属細菌に広く保存された配列ではないことが明らかとなった。さらに、*amiE* 周辺遺伝子の情報解析等により、*amiE* 遺伝子が外部から転移してきた可能性が考えられた。



## References

- [1] Yi-Hu Dong, Lian-Hui Wang, Lian-Hui Zhang (2007) Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Phil. Trans. R. Soc. B* **362**: 1201-1211.
- [2] Yi-Hu Dong, Jin-Ling Xu, Xian-Zhen Li, and Lian-Hui Zhang (2000) AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 3526-3531.
- [3] Yi-Han Lin, Jin-Ling Xu, Jiangyong Hu, Lian-Hui Wang, Say Leong Ong, Jared Renton Leadbetter, and Lian-Hui Zhang (2003) Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol. Microbiol.* **47**: 849-860.
- [4] Charles F. Sio, Linda G. Otten, Robbert H. Cool, Stephen P. Diggle, Peter G. Braun, Rein Bos, Mavis Daykin, Miguel Cámara, Paul Williams, and Wim J. Quax (2006) Quorum Quenching by an *N*-Acyl-Homoserine Lactone Acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect. Immun.* **74**: 1673-1682.
- [5] Sun-Yang Park, Hye-Ok Kang, Hak-Sun Jang, Jung-Kee Lee, Bon-Tag Koo, and Do-Young Yum (2005) Identification of Extracellular *N*-Acylhomoserine Lactone Acylase from a *Streptomyces* sp. and Its Application to Quorum Quenching. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2632-2641.
- [6] Declan M. Roche, Joseph T. Byers, Debra S. Smith, Freija G. Glansdorp, David R. Spring, Martin Welch (2004) Communications blackout? Do *N*-acylhomoserine-lactone-degrading enzymes have any role in quorum sensing?. *Microbiol.* **150**: 2023-2028.
- [7] Jared R. Leadbetter, E. P. Greenberg (2000) Metabolism of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by *Variovorax paradoxus*. *J. Bacteriol.* **182**: 6921-6926.
- [8] Sun-Yang Park, Sang Jun Lee, Tae-Kwang Oh, Jong-Won Oh, Bon-Tag Koo, Do-Young Yum, Jung-Kee Lee (2003) AhlD, an *N*-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiol.* **149**: 1541-1550.
- [9] Suvi Flagan, Weng-Ki Ching, Jared R. Leadbetter (2003) *Arthrobacter* Strain VAI-A Utilizes Acyl-Homoserine Lactone Inactivation Products and Stimulates Quorum Signal Biodegradation by *Variovorax paradoxus*. *Appl. Environ. Microbio.* **69**:909-916.

- [10] Yi-Hu Dong, Xi-Fen Zhang, Jin-Ling Xu, and Lian-Hui Zhang (2004) Insecticidal *Bacillus thuringiensis* Silences *Erwinia carotovora* Virulence by a New Form of Microbial Antagonism, Signal Interference. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 954-960.
- [11] Kok-Gan Chan, Steve Atkinson, Kalai Mathee, Choon-Kook Sam, Siri Ram Chhabra, Miguel Cámara, Chong-Lek Koh, and Paul Williams (2011) Characterization of *N*-acylhomoserine lactone-degrading bacteria associated with the *Zingiber officinale* (ginger) rhizosphere: Co-existence of quorum quenching and quorum sensing in *Acinetobacter* and *Burkholderia*. *BMC Microbiol.* **11**: 51.
- [12] Tomohiro Morohoshi, Atsushi Ebata, Shigehisa Nakazawa, Norihiro Kato, and Tsukasa Ikeda (2005) *N*-acyl Homoserine Lactone-Producing or -Degrading Bacteria Isolated from the Intestinal Microbial Flora of Ayu Fish (*Plecoglossus altivelis*). *Microbes Environ.* **20**: 264-268.
- [13] Lian-Hui Wang, Li-Xing Weng, Yi-Hu Dong, and Lian-Hui Zhang (2004) Specificity and Enzyme Kinetics of the Quorum-quenching *N*-Acyl Homoserine Lactone Lactonase (AHL-lactonase). *J. Biol. Chem.* **279**: 13645-13651.
- [14] Kristina M. Smith, Yigong Bu, and Hiroaki Suga (2003) Induction and Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing by Synthetic Autoinducer Analogs. *Chem. Biol.* **10**: 81-89.
- [15] Quan-Guo Zhang, Angus Buckling, Richard J. Ellis, and H. Charles J. Godfray (2009) Coevolution between cooperators and cheats in a microbial system. *Evolution*, **63**: 2248-2256.
- [16] Ricky L. Ulrich (2004) Quorum Quenching: Enzymatic Disruption of *N*-Acylhomoserine Lactone-Mediated Bacterial Communication in *Burkholderia thailandensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6173-6180.
- [17] Lázaro Molina, Fabio Rezzonico, Geneviève Défago, and Brion Duffy (2005) Autoinduction in *Erwinia amylovora*: Evidence of an Acyl-Homoserine Lactone Signal in the Fire Blight Pathogen. *J. Bacteriol.* **187**: 3206-3213.
- [18] Cornelia Reimann, Nathalie Ginet, Laurent Michel, Christoph Keel, Patrick Michaux, Viji Krishnapillai, Marcello Zala, Karin Heurlier, Karine Triandafillu, Hauke Harms, Geneviève Défago, and Dieter Haas (2002) Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiol.* **148**: 923-932.
- [19] A. Carlier, S. Uroz, B. Smadja, R. Fray, X. Latour, Y. Dessaux, and D. Faure (2003) The Ti Plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* Harbors an *attM*-Paralogous Gene, *aiiB*, Also Encoding *N*-Acyl Homoserine Lactonase Activity. *Appl. Environ.*

- Microbiol.* **69**: 4989-4993.
- [20] Stephane Uroz and Jussi Heinonsalo (2008) Degradation of *N*-acyl homoserine lactone quorum sensing signal molecules by forest root-associated fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* **65**: 271-278.
- [21] Jean J. Huang, Jong-In Han, Lian-Hui Zhang, Jared R. Leadbetter (2003) Utilization of Acyl-Homoserine Lactone Quorum Signals for Growth by a Soil Pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microb.* **69**: 5941-5949.
- [22] Tomohiro Morohoshi, Shigehisa Nakazawa, Atushi Ebata, Norihiro Kato, and Tsukasa Ikeda (2008) Identification and Characterization of *N*-Acylhomoserine Lactone-Acylase from the Fish Intestinal *Shewanella* sp. Strain MIB015. *Biosci. Biotech. Biochem.* **72**: 1887-1893.
- [23] Mariana Wahjudi, Evelina Papaioannou, Oktavia Hendrawati, Aart H. G. van Assen, Ronald van Merkerk, and Robbert H. Cool (2011) PA0305 of *Pseudomonas aeruginosa* is a quorum quenching acylhomoserine lactone acylase belonging to the Ntn hydrolase superfamily. *Microbiol.* **157**: 2042-2055.
- [24] Manuel Romero, Stephen P. Diggle, Stephan Heeb, Miguel Cámara, and Ana Otero (2008) Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase. *FEMS Microbiol. Lett.* **280**: 73-80.
- [25] Jean J. Huang, Ashley Petersen, Marvin Whiteley, and Jared R. Leadbetter (2006) Identification of QuiP, the Product of Gene PA1032, as the Second Acyl-Homoserine Lactone Acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1190-1197.
- [26] Fernando de la Cruz and Julian Davies (2000) Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol.* **8**: 128-133.
- [27] Michael G. Lorenz and Wilfried Wackernagel (1994) Bacterial Gene Transfer by Natural Genetic Transformation in the Environment. *Microbiol. Rev.* **58**: 563-602.
- [28] Stéphane Uroz, Yves Dessaux, and Phil Oger (2009) Quorum Sensing and Quorum Quenching: The Yin and Yang of Bacterial Communication. *ChemBioChem*, **10**: 205-216.
- [29] Kendra P. Rumbaugh, John A. Griswold, Barbara H. Iglewski, and Abdul N. Hamood (1999) Contribution of Quorum Sensing to the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in Burn Wound Infections. *Infect. Immun.* **67**: 5854-5862.
- [30] Tomohiro Morohoshi, Yoshiaki Tominaga, Nobutaka Someya, and Tsukasa Ikeda (2012) Complete genome sequence and characterization of the *N*-acylhomoserine

lactone-degrading gene of the potato leaf-associated *Solibacillus silvestris*. *J. Biosci. Bioeng.* **113**: 20-25.

- [31] A. W. Smith and B. H. Iglewski (1989) Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Nucleic Acids Res.* **17**: 10509.
- [32] Laura Steindler, Iris Bertani, Luisa De Sordi, Stephan Schwager, Leo Eberl, and Vittorio Venturi (2009) LasI/R and RhlI/R Quorum Sensing in a Strain of *Pseudomonas aeruginosa* Beneficial to Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 5131-5140.

## 第5章 結論

### 5.1. 本研究のまとめ

本研究では活性汚泥構成細菌中の AHL 合成細菌および分解細菌について解析を行った。AHL 合成細菌である *Aeromonas hydrophila* R2 株のバイオフィーム形成について調査を行った結果、バイオフィームの形成量は AHL を介した QS により制御されるほか、付着基質によっては AHL 非存在下でバイオフィームの初期付着が進まず、バイオフィーム形成が抑制されることが示唆された。また、AHL 分解細菌である *Acinetobacter* 属細菌 Ooi24 株については、その AHL 分解遺伝子 *amiE* を特定し、その分解機構や機能を評価した。AmiE は長鎖 AHL に対して強い分解活性を持つ新規な AHL アシラーゼであり、それが *Acinetobacter* 属細菌に広く保存された遺伝子ではなくトランスポゾンによって外部から転移してきた遺伝子である可能性が示唆された。

### 5.2. 今後の展望

#### 5.2.1. AHL 合成細菌（バイオフィーム）について

第3章において AHL 合成細菌の QS 制御により、バイオフィームの形成に少なからず影響を及ぼすことを示した。しかし、現状では QS 制御のみによるバイオフィーム形成抑制を工学的な技術として活用するのは難しい。とはいえ、実際の膜処理工程管理においてバイオフィームについて対策を考える際には、QS 制御がバイオフィーム形成に影響を及ぼすことは知識として持っておき、考慮しなければならない。

本文中でも触れたが、バイオフィーム形成機構をより詳細に把握するためには、QS により転写される遺伝子群の特定やそれにより生産・分泌される物質の同定や構造解析、さらにはそれらの物質が基質表面への細菌の付着に及ぼす影響や、バイオフィーム構造構築に及ぼす影響などについて、より詳細な調査が必要となる。バイオフィーム観察技術についても、生きた状態のものを経時的・定量的・非破壊的に観察可能な技術の普及が望まれる。このように、バイオフィーム形成やその構造の評価解析にあたり現段階では制約が多いが、今後のバイオサイエンス関連技術の発展に伴い、本研究では未解明に終わった上記要素の解明が期待される。

### 5.2.2. AHL 分解細菌 (AHL アシラーゼ) について

第4章において AHL 分解細菌の AHL 分解遺伝子を特定し、その解析を行った。本研究で実施した AHL 分解細菌の遺伝子解析結果は、それ自体が活性汚泥処理に目に見える影響を与えるということはないと思われる。あくまで基礎研究としての側面が強く、このような解析結果の蓄積を続けていくしかない。

本研究結果は QS の観点より、AHL アシラーゼとしての機能解析を行った。しかし、活性汚泥の処理活性という観点からは、これを汚水処理のためのひとつの有機物分解酵素と見することもできる。活性汚泥中の細菌について、それらが有する有機物分解酵素に関する研究結果は年々増え続けており、本研究で対象とした *Acinetobacter* 属細菌に関する報告だけでも多くを挙げることができる。各酵素の構造解析も LuxI/LuxR タンパク質と同様、今後進んでいくと考えられる。究極的には、汚水処理に必要な十分な種類の有機物分解酵素とその作用機構等が解明された暁には、それらの酵素を系内に並べておくだけで触媒反応を進行させるリアクターも夢ではない。そうなれば、遠い未来には活性汚泥など必要なくなるかもしれない。

## 謝辞

本研究を行うにあたり，特に論文作成や研究発表について多くのご指導ご鞭撻を賜りました池田宰教授に深く感謝いたします。また，実験全般を中心に，日々ご指導を賜りました諸星知広准教授に深く感謝いたします。ご多忙の中，再三に渡り本論文の研究審査会に時間を割いていただいた副指導教員の鈴木昇教授，柿井一男教授に深く感謝いたします。また，研究審査会に加え，副専門課題においてもご指導を賜りました飯村兼一准教授，吉原佐知雄准教授に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり，活性汚泥を提供していただいた財団法人栃木県建設総合技術センターに深く感謝いたします。

日々の研究室生活で温かく接していただいた生物工学研究室の皆様に深く感謝いたします。特に研究面においては，第3章のバイオフィルム形成試験を中心に数多くの実験に尽力していただいた山田和希くん，飯田栞さん，我妻隆樹くんにご深く感謝いたします。また，第4章のAHL分解遺伝子スクリーニングをはじめ，多くの地道な実験に尽力していただいた篠崎匡広くん，安本世良くんにご深く感謝いたします。

また，研究に関する行事等で特にお世話になりました，本学ソフトマテリアル研究室および水処理化学研究室の皆様，筑波大学野村暢彦研究室の皆様に深く感謝いたします。

## APPENDIX

### A. 第3章 シクロデキストリンを用いたバイオフィルム形成抑制試験

#### A.1. 概要

本研究グループでは Quorum Quenching (QQ) のひとつの手法として、シクロデキストリンを用いた AHL の包接化に関する研究を多く実施している。本論文第3章にて実施した *Aeromonas hydrophila* R2 株のバイオフィルム形成試験においても、シクロデキストリンの AHL 包接によるバイオフィルム形成抑制効果を調査した。結果的にはシクロデキストリンの添加によりバイオフィルムの形成は大幅に抑制されたが、その傾向は実験系における AHL の有無に依存しておらず、QQ とは異なる要因による現象であると考えられた。そのため本論文中には記載しなかったが、他の細菌ではあまり見られない興味深い現象も観察されたため、ここではその結果を報告する。

#### A.2. シクロデキストリンについて

シクロデキストリン(Cyclodextrin, CD)は5個以上のD-グルコースが $\alpha$ -(1,4)グルコシド結合によって結合し、環状構造を形成したオリゴ糖の一種である。グルコースが6個、7個、8個結合して環状構造を形成したものをそれぞれ $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD、 $\gamma$ -CDと呼び、工業的にも広く生産・利用されている (Table A-1<sup>[1]</sup>参照)。

CDは環状構造の内部が空孔となっており、ここに様々な分子を包接することができる。空孔の外側はヒドロキシ基が多く配置されているため親水性である一方、空孔内部は無極性の水素原子や酸素原子により疎水性となっている。この性質により、特に疎水性を示す様々なゲスト分子と包接複合体を形成しやすいという特徴がある。

**Table A-1 Property of cyclodextrin**

Property	$\alpha$ -Cyclodextrin	$\beta$ -Cyclodextrin	$\gamma$ -Cyclodextrin
Number of glucopyranose units	6	7	8
Molecular weight [g/mol]	972	1135	1297
Solubility in water at 25°C [g/100 mL]	14.5	1.85	23.2
Outer diameter [Å]	14.6	15.4	17.5
Cavity diameter [Å]	4.7 ~ 5.3	6.0 ~ 6.5	7.5 ~ 8.3
Height of torus [Å]	7.9	7.9	7.9
Cavity volume [Å <sup>3</sup> ]	174	262	427



### A.3. CD による AHL の包接化

本研究グループでは、 $\alpha$ -CD および  $\beta$ -CD が AHL のアシル鎖を包接し、水溶液中で AHL-CD 複合体を形成することを確認している<sup>[2, 3]</sup>。Fig. A-1 は CD による AHL 包接形態を模式的に示したものである。既往の研究によると、天然（非修飾）の  $\beta$ -CD を加えることにより、*Chromobacterium violaceum* CV026 株の violacein 生産および *Serratia marcescens* AS-1 株の prodigiosin 生産は AHL 包接効果により共に 50%程度にまで抑制することができる（これをアルキルアミンで修飾した CD では結合定数が上昇し、修飾アルキルアミン鎖長によってはこれらの化合物生産を 100%近く抑制することができる）<sup>[4]</sup>。

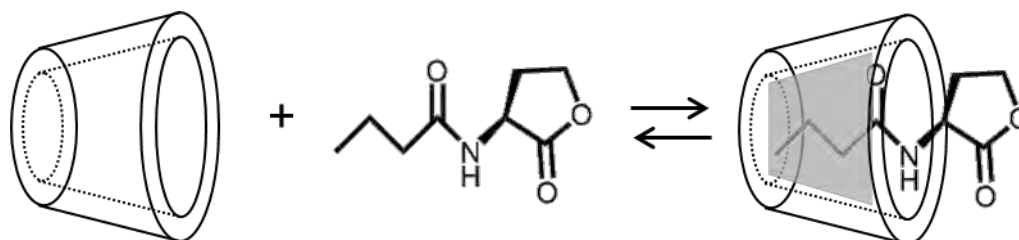


Fig. A-1 Presumable schematic diagram of AHL inclusion by CD

### A.4. 実験方法

実験方法は第 3 章の 96 穴マイクロタイタープレートを用いたバイオフィーム定量試験と同様であるため、詳細な実験手順はそちらを参照されたい。簡潔な実験方法は以下に記す。菌体として R2 株と AHL 合成遺伝子破壊株を用い、それぞれについて  $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD、 $\gamma$ -CD を最終濃度 10 mM となるように添加した R2A 液体培地を用意した。さらに AHL 合成遺伝子破壊株を用いた条件のうち、一部については C4-HSL を最終濃度 10  $\mu$ M となるように添加した。以上の実験条件は Table A-2 に示した。これを 96 穴プレートに 100  $\mu$ L ずつ分注し、30°C で 24 h 培養した。培養後のバイオフィーム評価にはクリスタルバイオレット染色による吸光度測定を用いた。

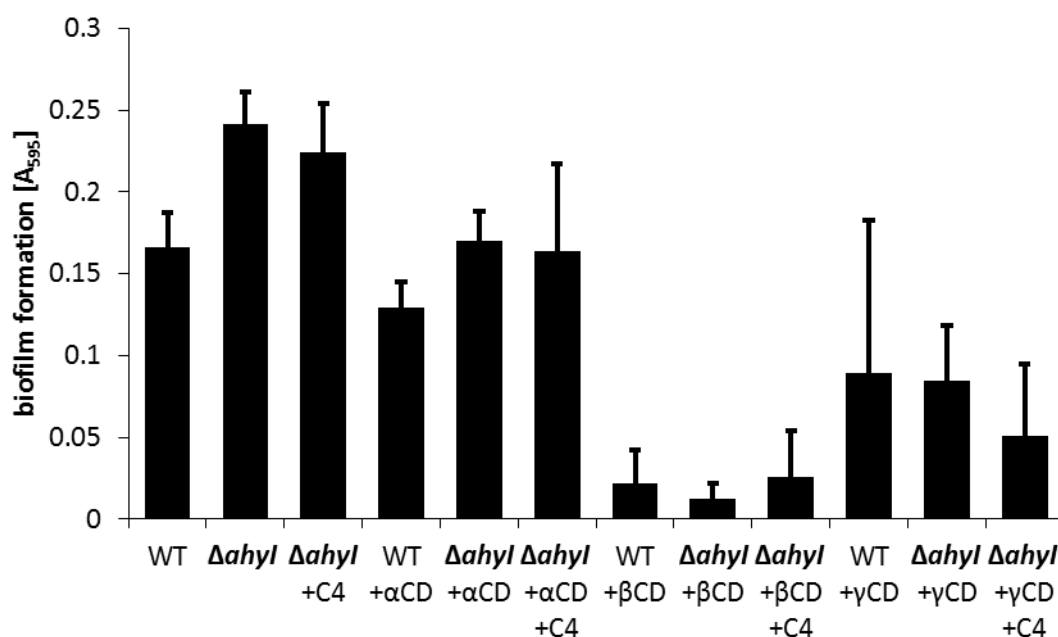
### A.5. 実験結果と考察

実験結果を Fig. A-2 に示す。CD を添加したすべての条件において、野生株と比較して一定のバイオフィーム形成抑制効果が確認された。中でも、 $\beta$ -CD を投入した際のバイオフィーム形成抑制効果が突出していた。しかし、いずれの CD を用いた条件でも、AHL 合成遺伝子破壊株に外部から C4-HSL を添加したことによるバイオフィーム形成への影響は観察

されなかった. このことから, CD を添加したことによるバイオフィーム抑制は AHL を介した QS によるものではなく, 他の何らかの現象による効果であると考えられる.

**Table A-2 Experimental conditions**

Bacterial strain	CD addition	AHL addition
R2 wild type	-	-
R2 $\Delta$ <i>ahyI</i>	-	-
R2 $\Delta$ <i>ahyI</i>	-	+C4-HSL (10 $\mu$ M)
R2 wild type	+ $\alpha$ -CD (10 mM)	-
R2 $\Delta$ <i>ahyI</i>	+ $\alpha$ -CD (10 mM)	-
R2 $\Delta$ <i>ahyI</i>	+ $\alpha$ -CD (10 mM)	+C4-HSL (10 $\mu$ M)
R2 wild type	+ $\beta$ -CD (10 mM)	-
R2 $\Delta$ <i>ahyI</i>	+ $\beta$ -CD (10 mM)	-
R2 $\Delta$ <i>ahyI</i>	+ $\beta$ -CD (10 mM)	+C4-HSL (10 $\mu$ M)
R2 wild type	+ $\gamma$ -CD (10 mM)	-
R2 $\Delta$ <i>ahyI</i>	+ $\gamma$ -CD (10 mM)	-
R2 $\Delta$ <i>ahyI</i>	+ $\gamma$ -CD (10 mM)	+C4-HSL (10 $\mu$ M)



**Fig. A-2 Biofilm formation of *Aeromonas hydrophila* under presence of cyclodextrins**

Effect of  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ -CDs toward biofilm formation was investigated using 96-well plates. All three types of CDs, especially  $\beta$ -CD, reduced biofilm formation after 24 h incubation, but had no effect by the addition of C4-HSL, implying that the addition of CD has some biofilm reduction mechanisms other than QQ.

## A.6. 備考 ～CD の添加と菌体増殖～

本論文第3章の実験では、R2 野生株について、その AHL 合成遺伝子破壊や C4-HSL 添加による菌体増殖への影響の確認を行った。本実験においても、CD の添加による R2 野生株の菌体増殖への影響を確認した。実験方法、評価方法は本論文第3章 (3.4.3.節) に示した手順と同様である。α-CD, β-CD, γ-CD を添加したときの結果をそれぞれ Fig. A-3, Fig. A-4, Fig. A-5 に示す。α-CD は増殖に影響を与えなかったものの、β-CD および γ-CD ではそれぞれの添加量に比例して増殖率が増加した。一般的には CD が菌体増殖に影響を与えることはあまりないが、*Bordetella pertussis* (百日咳菌) <sup>[5]</sup>や *Helicobacter pylori* (ピロリ菌) <sup>[6, 7]</sup> など一部菌種については増殖促進が報告されている。そのメカニズムとしては、

- ① CD による増殖阻害物質の包接化
- ② 増殖に必要な成分の吸収促進
- ③ 増殖に必要な成分の安定化

が挙げられている<sup>[5]</sup>。①の増殖阻害物質の例として硫黄や過酸化物、不飽和脂肪酸などが挙げられる。②の吸収促進については、CD がアルブミンなどと同様にキャリアとして機能していることが考えられている。③については、医薬業界で安定剤としての CD の効果は広く知られており、それにより増殖に必要な成分を系内に効果的に保持するという考え方である。

本研究では、β-CD および γ-CD の添加により R2 株の菌体増殖が促進されただけでなく、同時にバイオフィルム抑制効果も確認された。このことから、R2 株が分泌した成分のうち、増殖阻害物質または必須物質のほか、基質の付着に関与する物質などが CD に包接されたと考えられる。

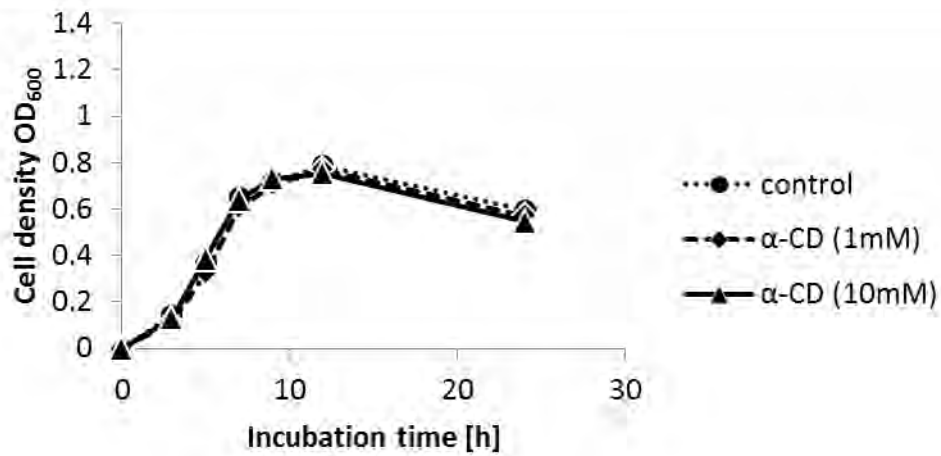


Fig. A-3 Bacterial growth of R2 wild type strain under presence of  $\alpha$ -CD

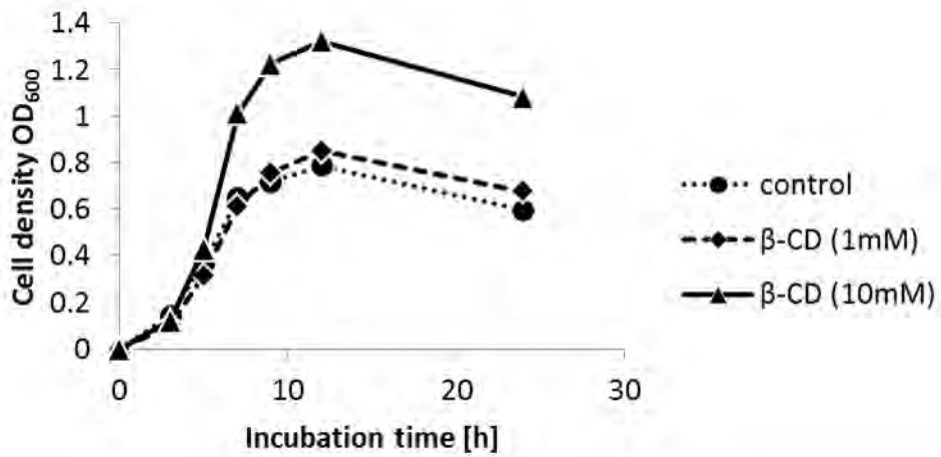


Fig. A-4 Bacterial growth of R2 wild type strain under presence of  $\beta$ -CD

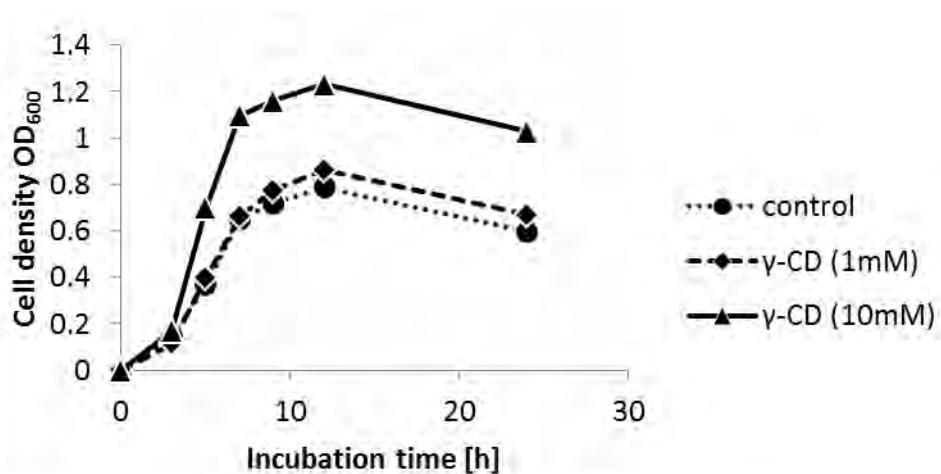


Fig. A-5 Bacterial growth of R2 wild type strain under presence of  $\gamma$ -CD

## References

- [1] E. M. Martin Del Valle (2004) Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* **39**: 1033-1046.
- [2] Norihiro Kato, Tomohiro Morohoshi, Tomoya Nozawa, Hitomi Matsumoto, and Tsukasa Ikeda (2006) Control of Gram-Negative Bacterial Quorum Sensing with Cyclodextrin Immobilized Cellulose Ether Gel. *J. Incl. Phenom. Macro.* **56**: 55-59.
- [3] Norihiro Kato, Toru Tanaka, Shota Nakagawa, Tomohiro Morohoshi, Kazuhisa Hiratani, and Tsukasa Ikeda (2007) Control of virulence factor expression in opportunistic pathogens using cyclodextrin immobilized gel. *J. Incl. Phenom. Macro.* **57**: 419-423.
- [4] Tomohiro Morohoshi, Kazuho Tokita, Satoshi Ito, Yuki Saito, Saki Maeda, Norihiro Kato, and Tsukasa Ikeda (2013) Inhibition of quorum sensing in gram-negative bacteria by alkylamine-modified cyclodextrins. *J. Biosci. Bioeng.* **116**: 175-179.
- [5] Atsushi Imaizumi, Yoji Suzuki, Shoji Ono, Hiroko Sato, and Yuji Sato (1983) Heptakis(2,6-*O*-Dimethyl) $\beta$ -Cyclodextrin: a Novel Growth Stimulant for *Bordetella pertussis* Phase I. *J. Clin. Microbiol.* **17**: 781-786.
- [6] R. Olivieri, M. Bugnoli, D. Armellini, S. Bianciardi, R. Rappuoli, P. F. Bayeli, L. Abate, E. Esposito, L. De Gregorio, J. Aziz, C. Basagni, and N. Figura (1993) Growth of *Helicobacter pylori* in Media Containing Cyclodextrins. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 160-162.
- [7] Antonio Marchini, Maria d'Apolito, Paola Massari, Marco Atzeni, Michael Copass, and Robert Olivieri (1995) Cyclodextrins for growth of *Helicobacter pylori* and production of vacuolating cytotoxin. *Arch. Microbiol.* **164**: 290-293.

## B. 第3章 バイオフィルム膜厚および表面被覆率の概算

### B.1. 概要

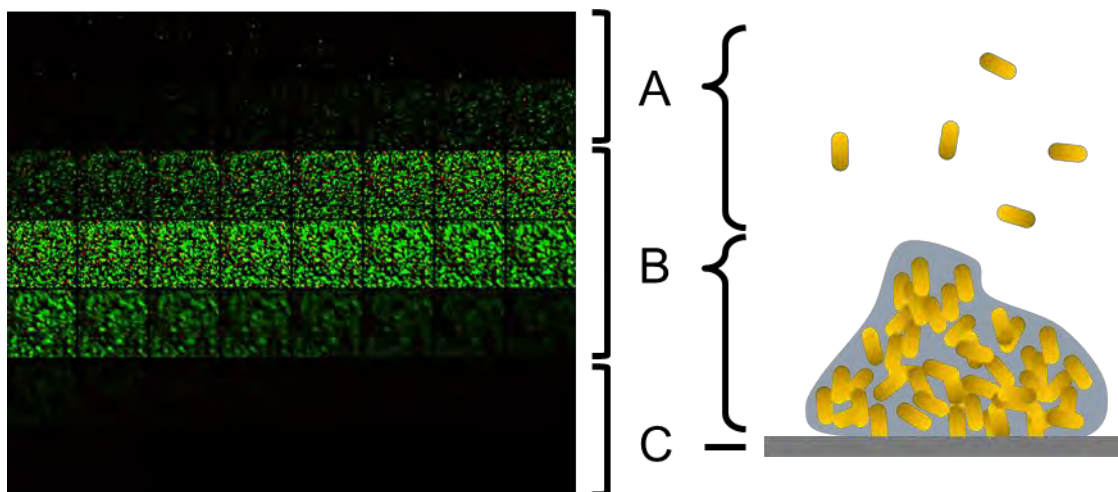
本論文第3章において、共焦点レーザ走査型顕微鏡(CLSM)によるバイオフィルム測定を実施した (Fig. 3-10 ~ Fig. 3-26 参照). それぞれの図にはバイオフィルム膜厚の目安となるスケールを表示しているが、この値は測定の際のz軸走査条件設定によって大きく変わってしまうため、膜厚の定量的な評価には繋がらない。また、バイオフィルムの表面状態に関する定量的な指標もソフトウェアからの出力が難しい。そこでここでは、バイオフィルムの状態をより定量的に把握するため、取得画像の数値情報からバイオフィルム膜厚および表面被覆率の概算を試みた。なお、本方法は菌体を染色した結果より得られた情報を元にしており、細胞外多糖等のバイオフィルム構成マトリックスの情報は含まれていないため、実際の数値と比較すると過小評価している可能性がある。しかし、同一の観察条件で取得した画像について同一の条件による解析を実施していることから、少なくとも各実験条件間の相対評価は可能であると考えた。

### B.2. バイオフィルム膜厚算出法

本論文第3章で触れたが、各図の3次元画像はバイオフィルムの厚さ方向に焦点距離を変えながら50枚の2次元画像を撮影し、積層して表示している。各2次元画像より、その画像における発光強度別の頻度を示したヒストグラムを出力することが可能である。一例として、R2野生株をカバーガラス上で120h培養した条件におけるバイオフィルム観察結果(Fig. 3-12)について、元の積層画像をFig. B-1に、そのうちの1つについての発光強度ヒストグラムをFig. B-2にそれぞれ示す。

ここで、Fig. B-2に着目すると、最も発光強度が強い”Intensity = 4096”の頻度、および発光が検出されない”Intensity = 0”の頻度が突出していることが分かる。この2点を除くと、発光強度が低下するにつれて頻度が徐々に増加するようなグラフとなるが、低発光強度のデータはノイズ成分であると考えられる。発光強度が大きい方がその平面における情報(細胞密度)を正確に示していると考えられることと、”Intensity = 4096”の値が突出していることから、本研究では”Intensity = 4096”の頻度値が該当する平面のバイオフィルム情報を代表しうるとみなし、各2次元画像における同様のヒストグラムより”Intensity = 4096”の頻度値を抽出した。これについてもFig. B-1およびFig. B-2と同様に、R2野生株を120h培養した条件により得られた解析データを例として、Fig. B-3の右側のグラフにその抽出結

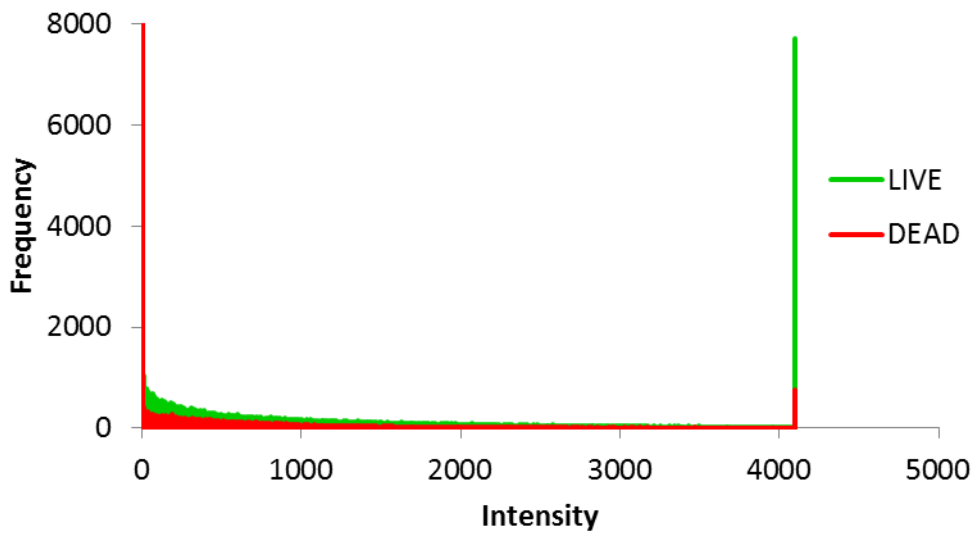
果を示す．縦軸の画像枚数は Fig. B-3 左側の 2 次元画像と概ね対応している．この 50 枚を撮影する間の z 軸走査距離は Fig. 3-12 に示したとおり 122.50  $\mu\text{m}$  であることから，縦軸を走査距離に変更すると Fig. B-4 (A) のようになる．これを 2 階微分したときの正方向のピークが，バイオフィルムのエッジを擬似的に表しているといえる (Fig. B-4 (B) 参照)．さらに前後の値を用いて移動平均を算出すると，Fig. B-4 (C) のように平滑化される．このときに得られた 2 つのピーク間距離を擬似的なバイオフィルム膜厚とした．ピーク間距離の値は生細胞と死細胞それぞれの解析結果より得られるが，本研究ではよりピーク間距離が広い方の結果を擬似的なバイオフィルム膜厚とみなした．



**Fig. B-1 Biofilm formation of R2 wild type strain after 120 h incubation**

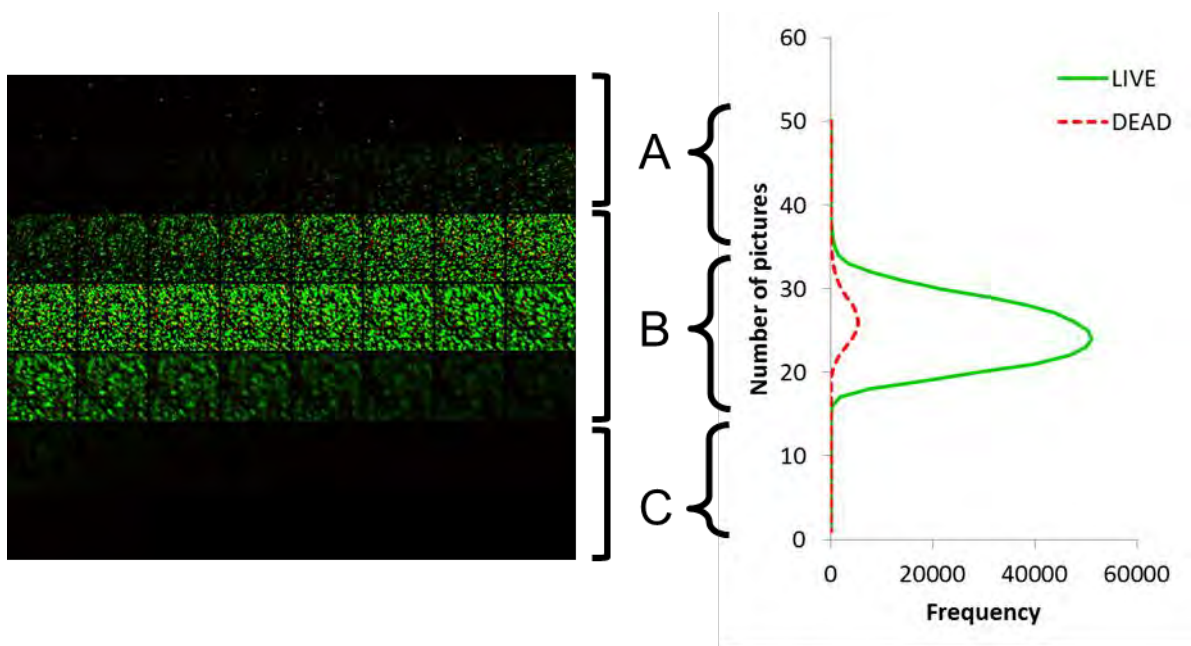
~ 50 pictures of 2-dimensional images before synthesizing 3-dimensional image ~

Each picture was taken successively from top to the bottom of biofilm. A, B, and C approximately indicates aqueous phase, biofilm phase, and cover glass respectively, as shown in the right side of the figure.



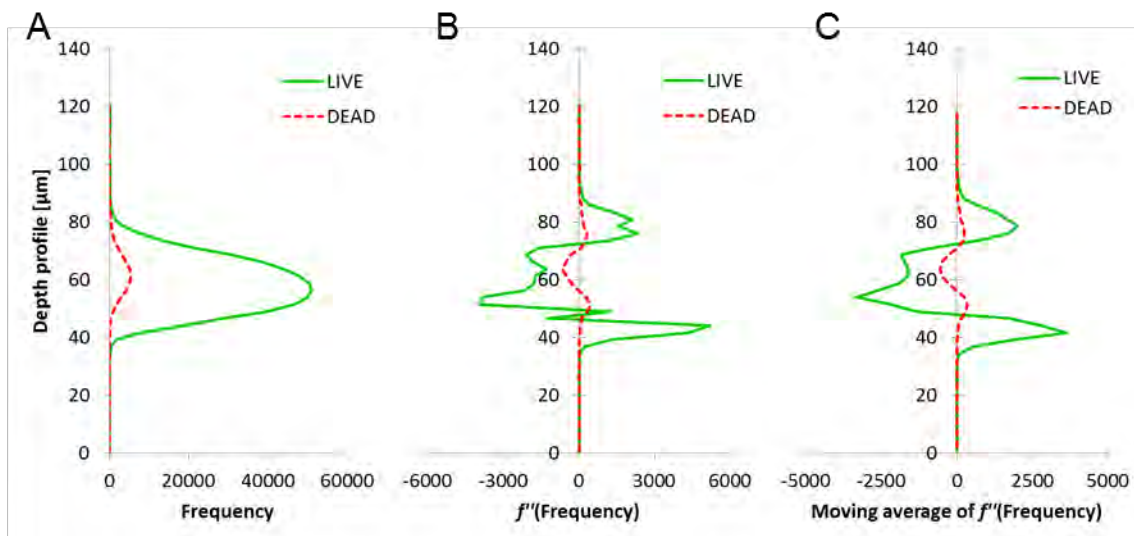
**Fig. B-2 Histogram of emission intensity in a certain 2-dimensional image**

Frequency of maximum intensity ( $x = 4096$ ) was selected for further analysis, since the data may sufficiently represent the biofilm (or cell density) information in the 2-dimensional image.



**Fig. B-3 Maximum intensity frequency data extracted from histogram of each 2-dimensional image**





**Fig. B-4 Estimation of biofilm thickness**

(A) Data of Fig. B-3 with vertical axis converted to the depth profile. (B) Second order differential value derived from A. (C) Moving average deviations derived from B, for the purpose of smoothing. Two adjacent data were used for calculation. Peak-to-peak distance was assumed as biofilm thickness.

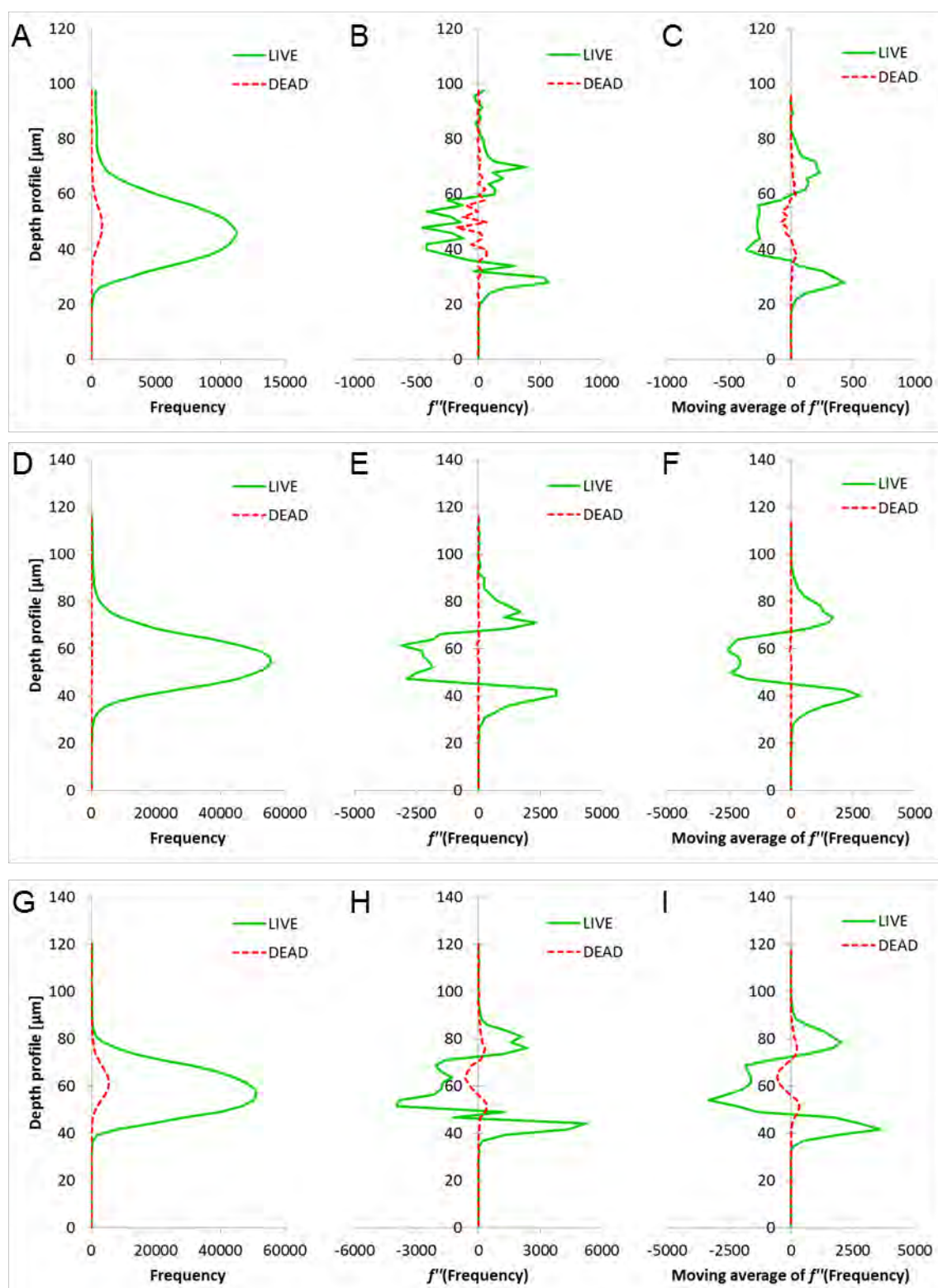
### B.3. 表面被覆率算出法

表面被覆率の算出には、2次元画像の積層により出力した3次元画像を用いた。本論文内の3次元出力結果は、厚さを含めたバイオフィーム全体像を把握するため斜め方向からの撮影画像を使用した。ここではx-y平面を真上から見下ろした(膜厚情報を排除した)画像を用いた。使用する画像の種類として、生細胞と死細胞の両方の情報が含まれた画像、生細胞のみの画像、死細胞のみの画像の3種類を検討した結果、生細胞と死細胞の両方の情報が含まれた画像が表面被覆率を的確に表現しているように思われた。この画像に対し、画像処理用フリーソフトJTrimを用いて2階調化処理を実施した。境界しきい値は30とした。その後ヒストグラムを参考に、以下の式により表面被覆率を算出した。

$$\text{表面被覆率(\%)} = \frac{\text{白色画素数}}{\text{全画素数}} \times 100$$

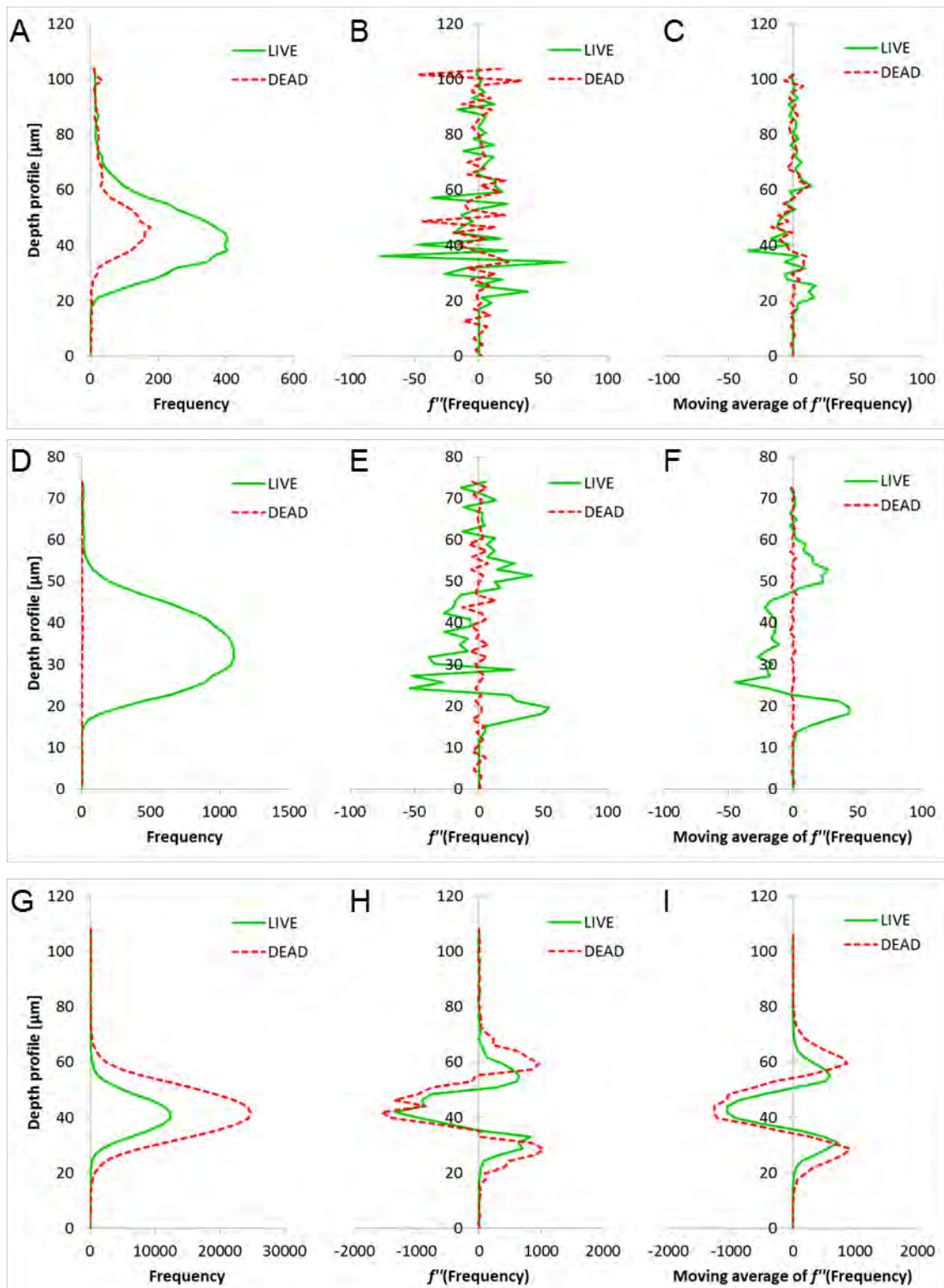
#### B.4. 結果

バイオフィルム膜厚の概算過程で得られた個々の発光強度情報および膜厚導出過程のグラフを Fig. B-5 から Fig. B-10 に、表面被覆率算出に用いた元画像およびその 2 値化処理後の画像を Fig. B-11 から Fig. B-16 に示す。前者の一連のグラフから得られたピーク値およびそこから導出されたバイオフィルム膜厚値を Table B-1 に、後者の一連の画像から得られたピクセル値およびそこから導出された表面被覆率を Table B-2 にそれぞれまとめて示した。



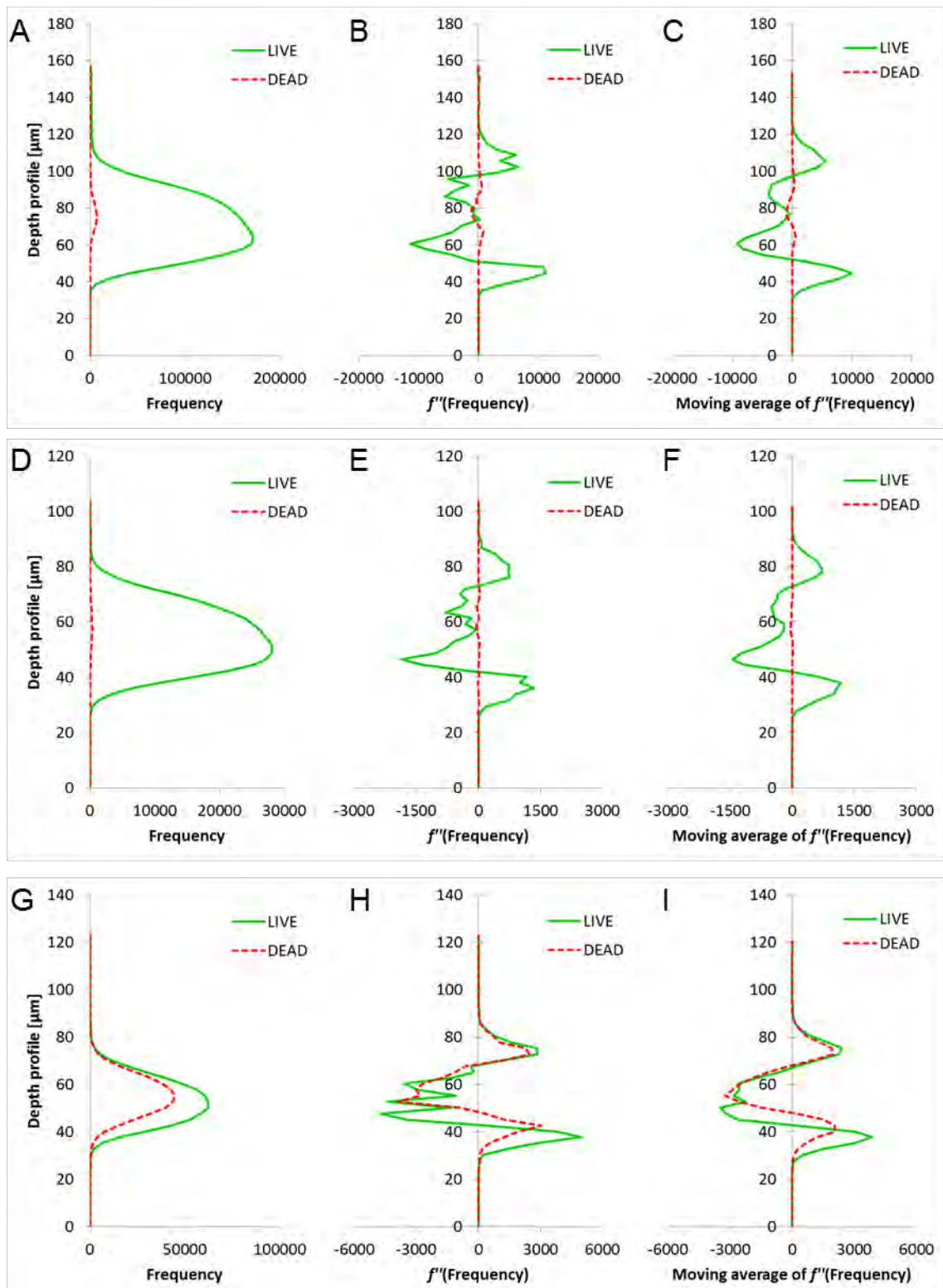
**Fig. B-5 Thickness estimation of biofilm formed by R2 wild type strain incubation**

(A) ~ (C) Results after 24 h incubation. (D) ~ (F) Results after 72 h incubation. (G) ~ (I) Results after 120 h incubation. Details of each graph are described previously in Fig. B-4.



**Fig. B-6 Thickness estimation of biofilm formed by R2  $\Delta$ ahyI strain incubation**

(A) ~ (C) Results after 24 h incubation. Biofilm thickness was unable to evaluate in this condition. (D) ~ (F) Results after 72 h incubation. (G) ~ (I) Results after 120 h incubation. Details of each graph are described previously in Fig. B-4.

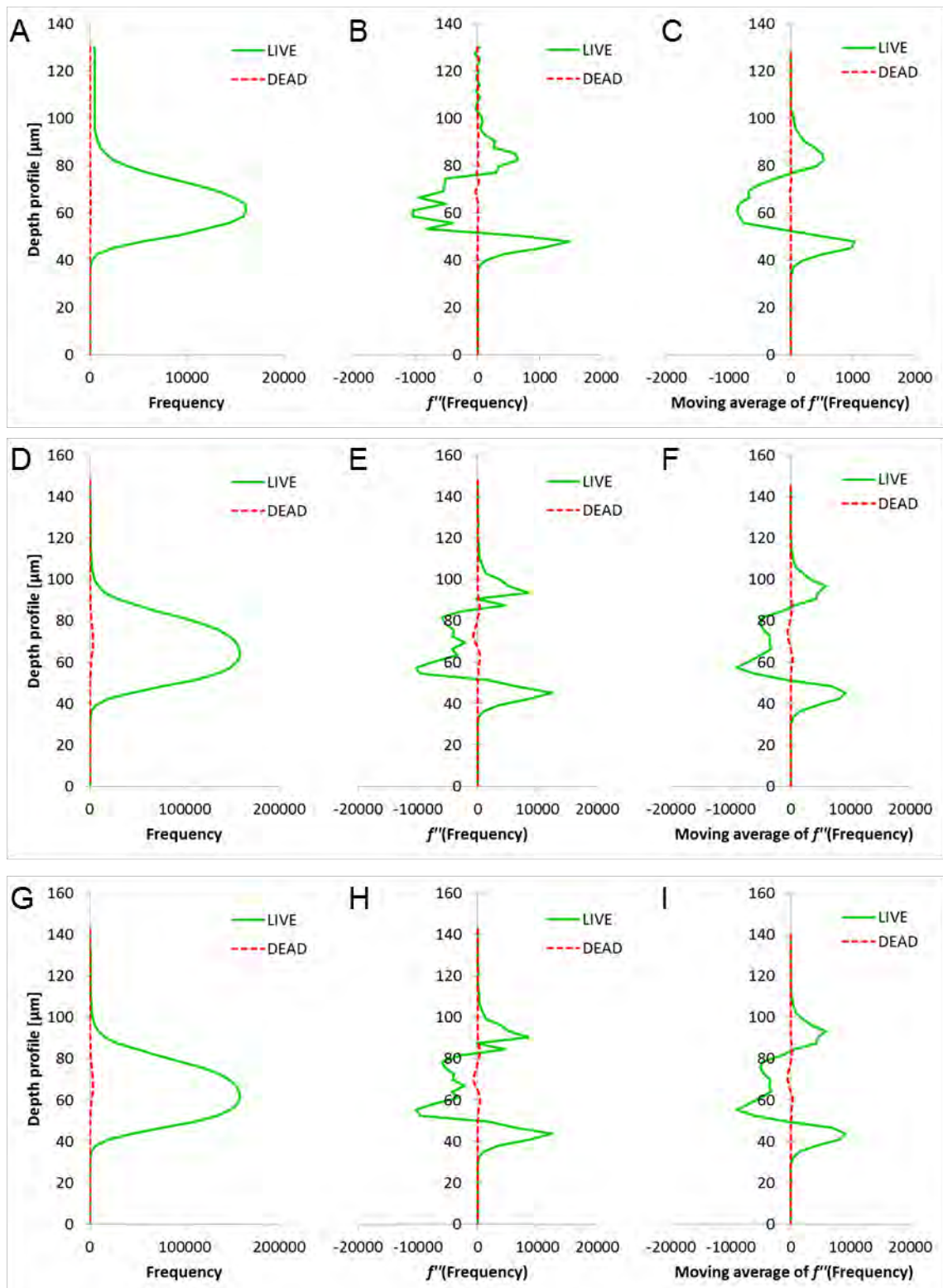


**Fig. B-7 Thickness estimation of biofilm formed by R2  $\Delta$ ahyI strain incubation**

**(C4-HSL initially added)**

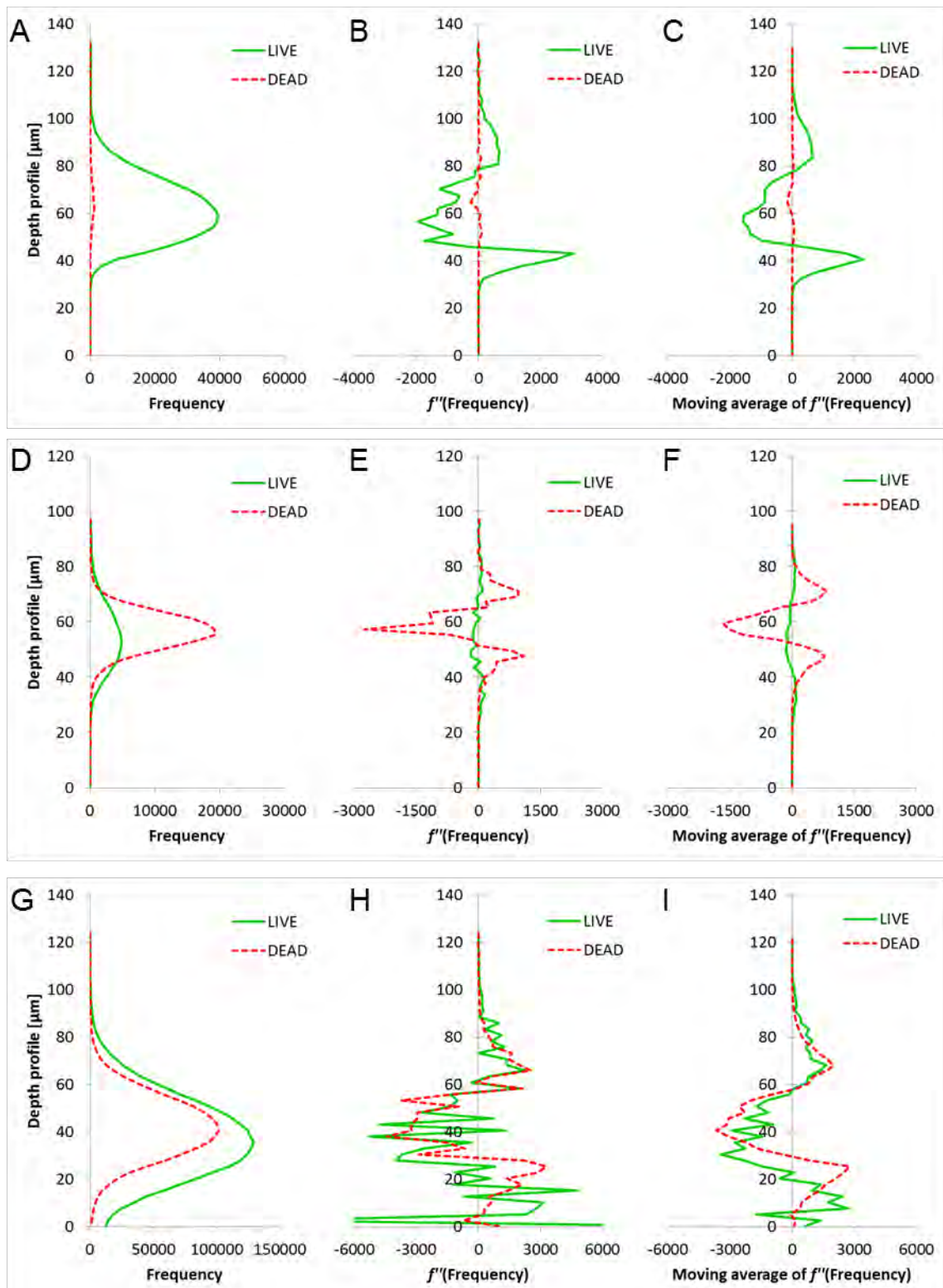
(A) ~ (C) Results after 24 h incubation. (D) ~ (F) Results after 72 h incubation. (G) ~ (I)

Results after 120 h incubation. Details of each graph are described previously in Fig. B-4.



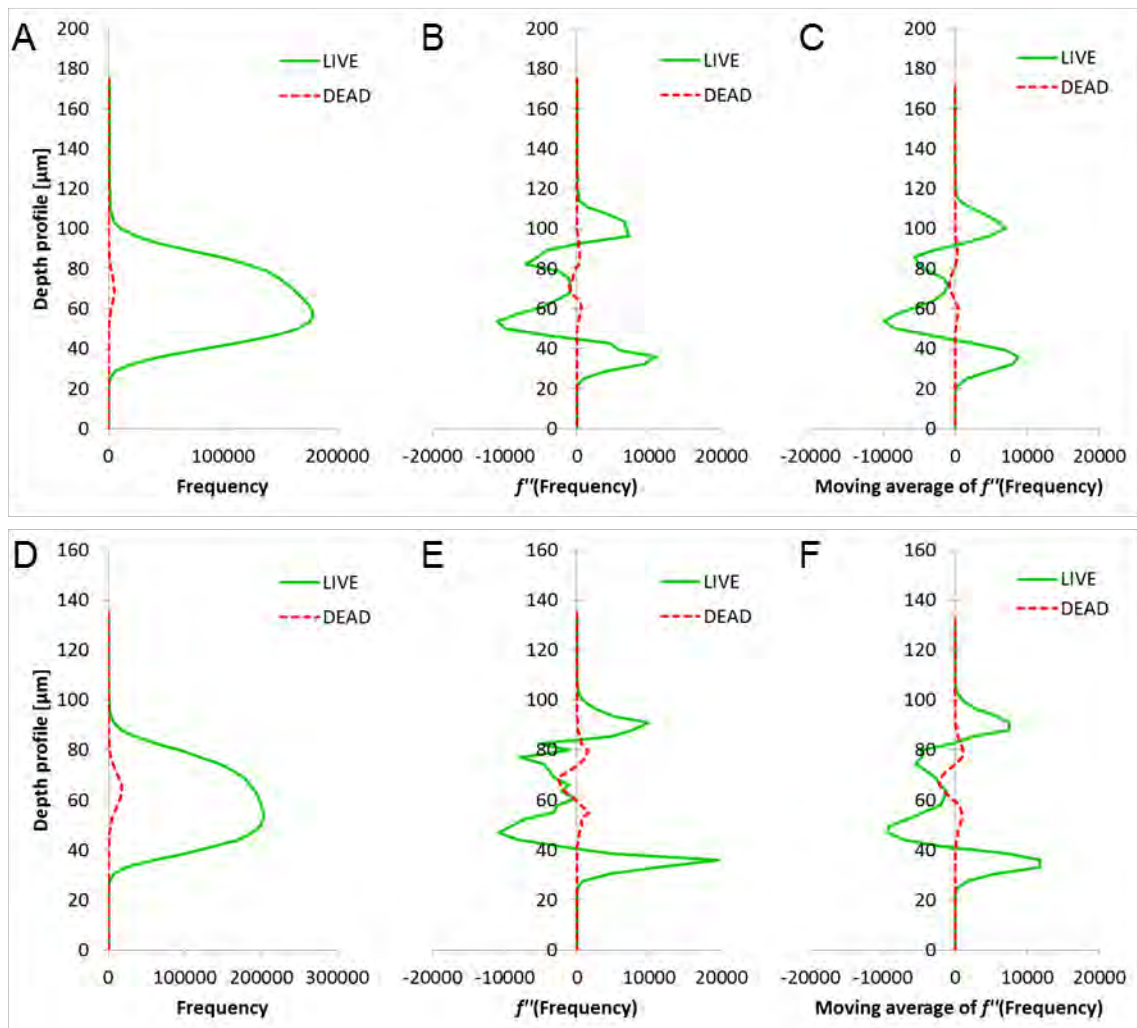
**Fig. B-8 Thickness estimation of biofilm formed by R2 wild type strain incubation (gas-liquid interface)**

(A) ~ (C) Results after 24 h incubation. (D) ~ (F) Results after 72 h incubation. (G) ~ (I) Results after 120 h incubation. Details of each graph are described previously in Fig. B-4.



**Fig. B-9 Thickness estimation of biofilm formed by R2  $\Delta$ ahyI strain incubation (gas-liquid interface)**

(A) ~ (C) Results after 24 h incubation. (D) ~ (F) Results after 72 h incubation. (G) ~ (I) Results after 120 h incubation. Details of each graph are described previously in Fig. B-4.

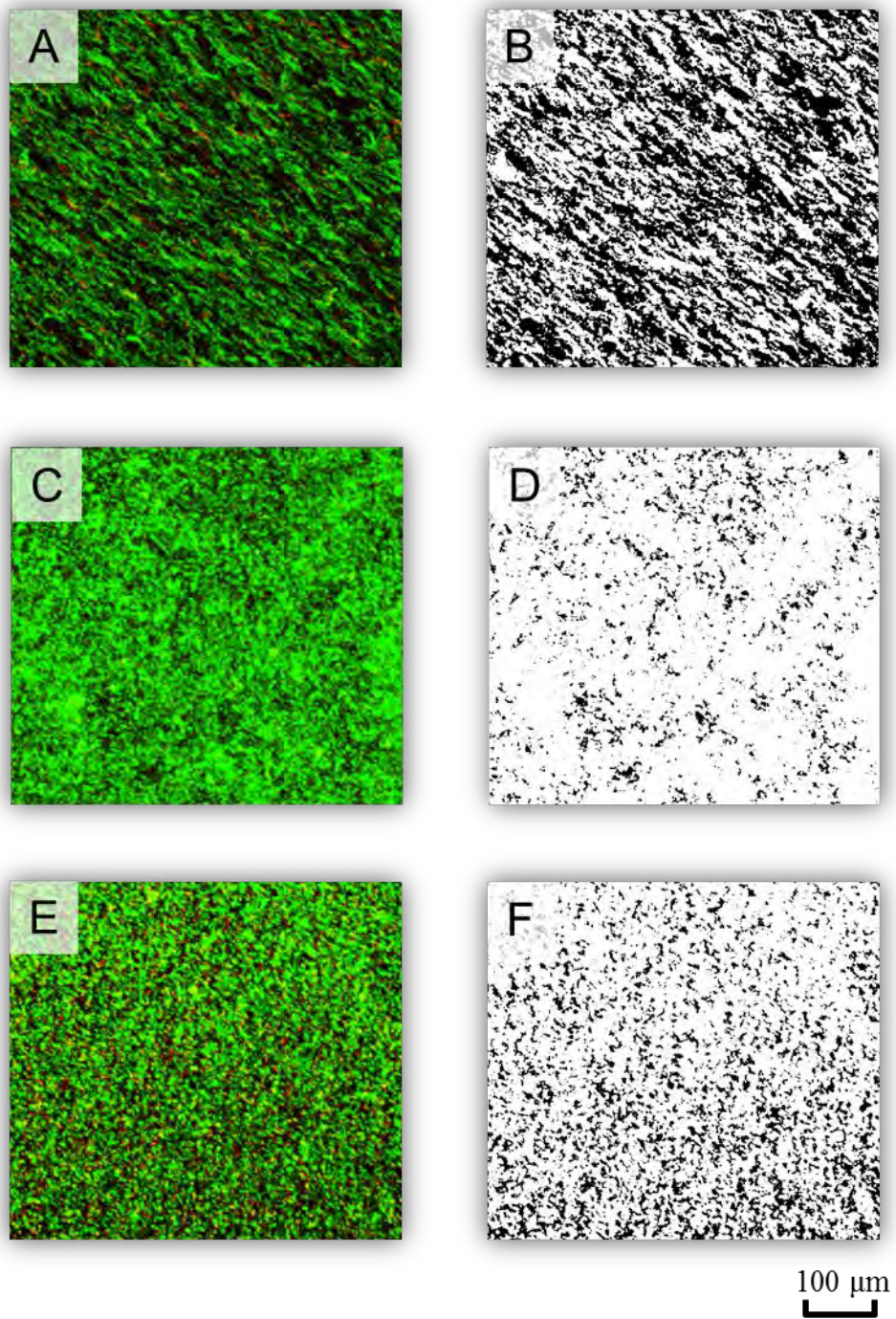


**Fig. B-10 Thickness estimation of biofilm formed by R2  $\Delta$ *ahyI* strain incubation**

**(gas-liquid interface, C4-HSL initially added)**

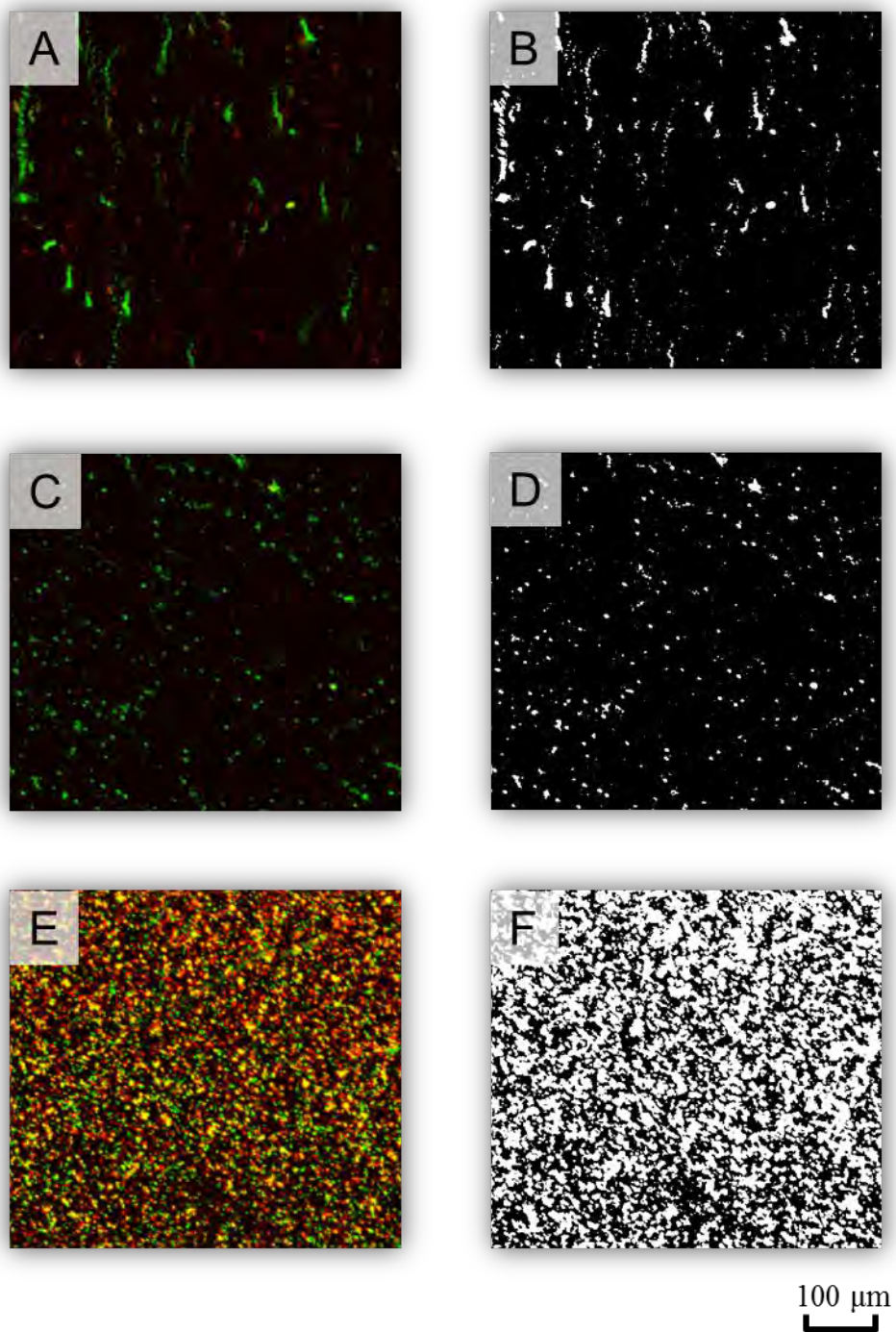
(A) ~ (C) Results after 24 h incubation. (D) ~ (F) Results after 72 h incubation. Details of each graph are described previously in Fig. B-4.





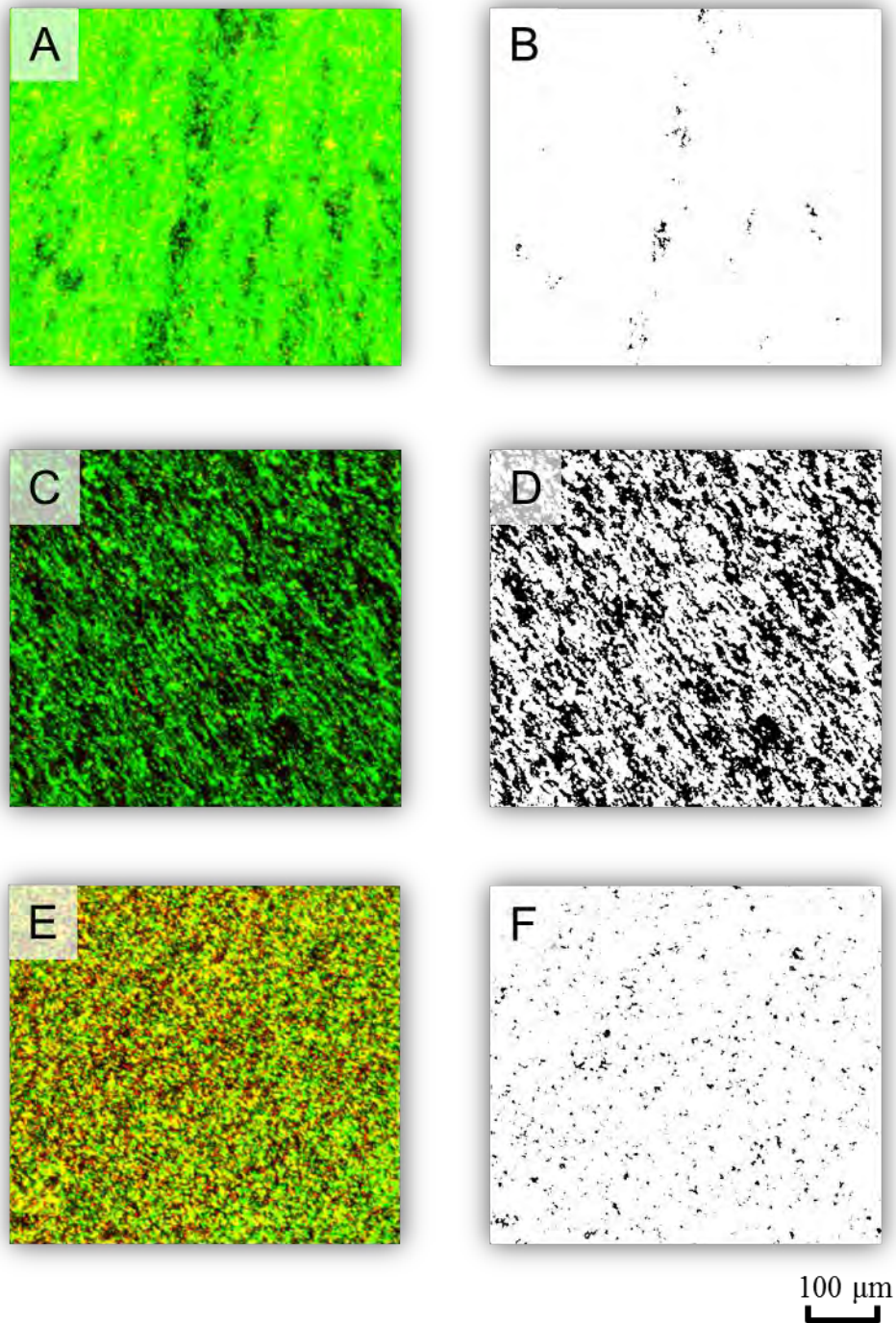
**Fig. B-11 3-dimensional images of biofilm formed by R2 wild type strain obtained for surface coverage analysis**

(A) Result after 24 h incubation. (C) Result after 72 h incubation. (E) Result after 120 h incubation. (B), (D), and (F) are binarization images of (A), (C), and (E), respectively.



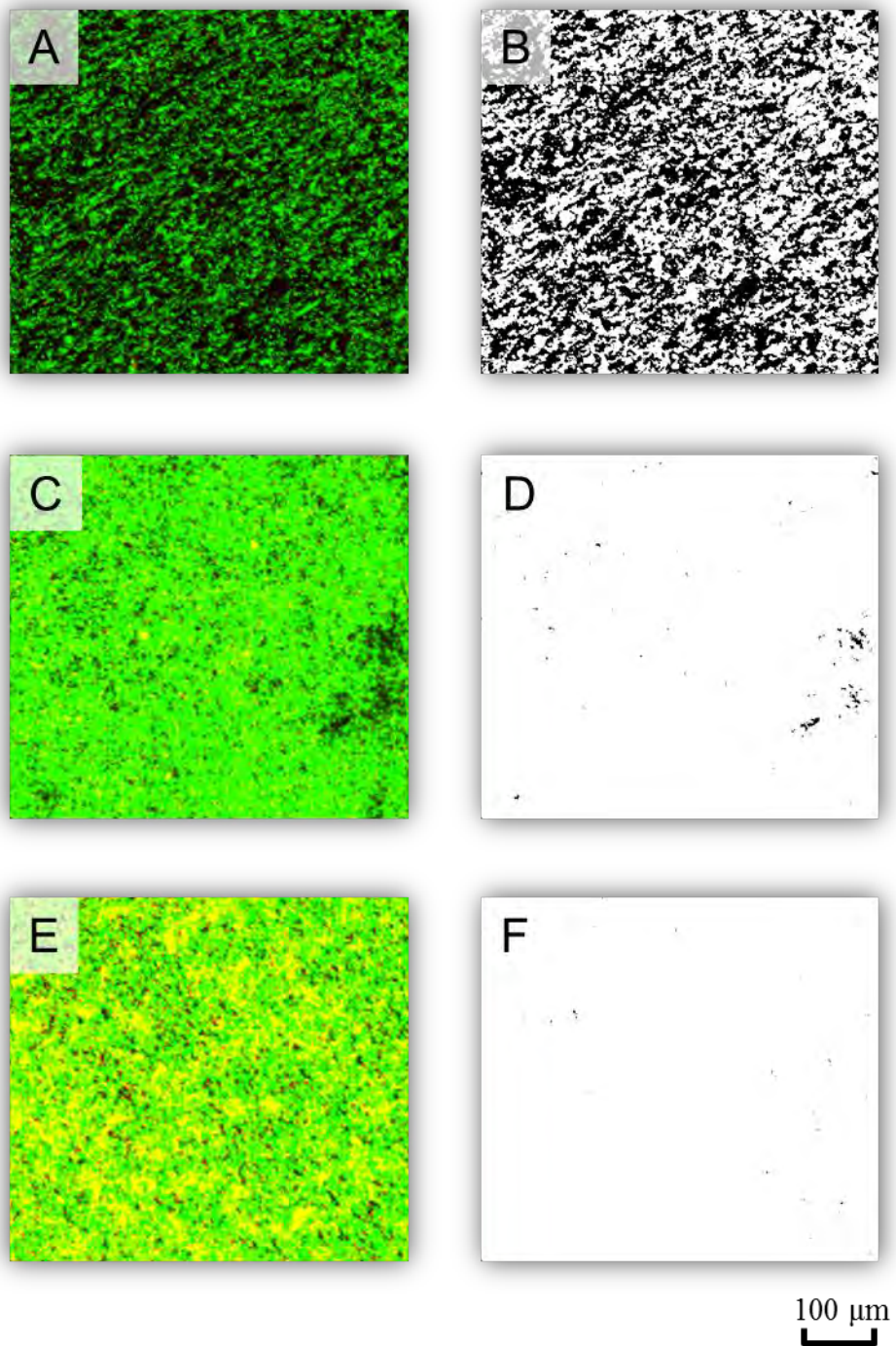
**Fig. B-12 3-dimensional images of biofilm formed by R2  $\Delta$ ahyI strain obtained for surface coverage analysis**

(A) Result after 24 h incubation. (C) Result after 72 h incubation. (E) Result after 120 h incubation. (B), (D), and (F) are binarization images of (A), (C), and (E), respectively.



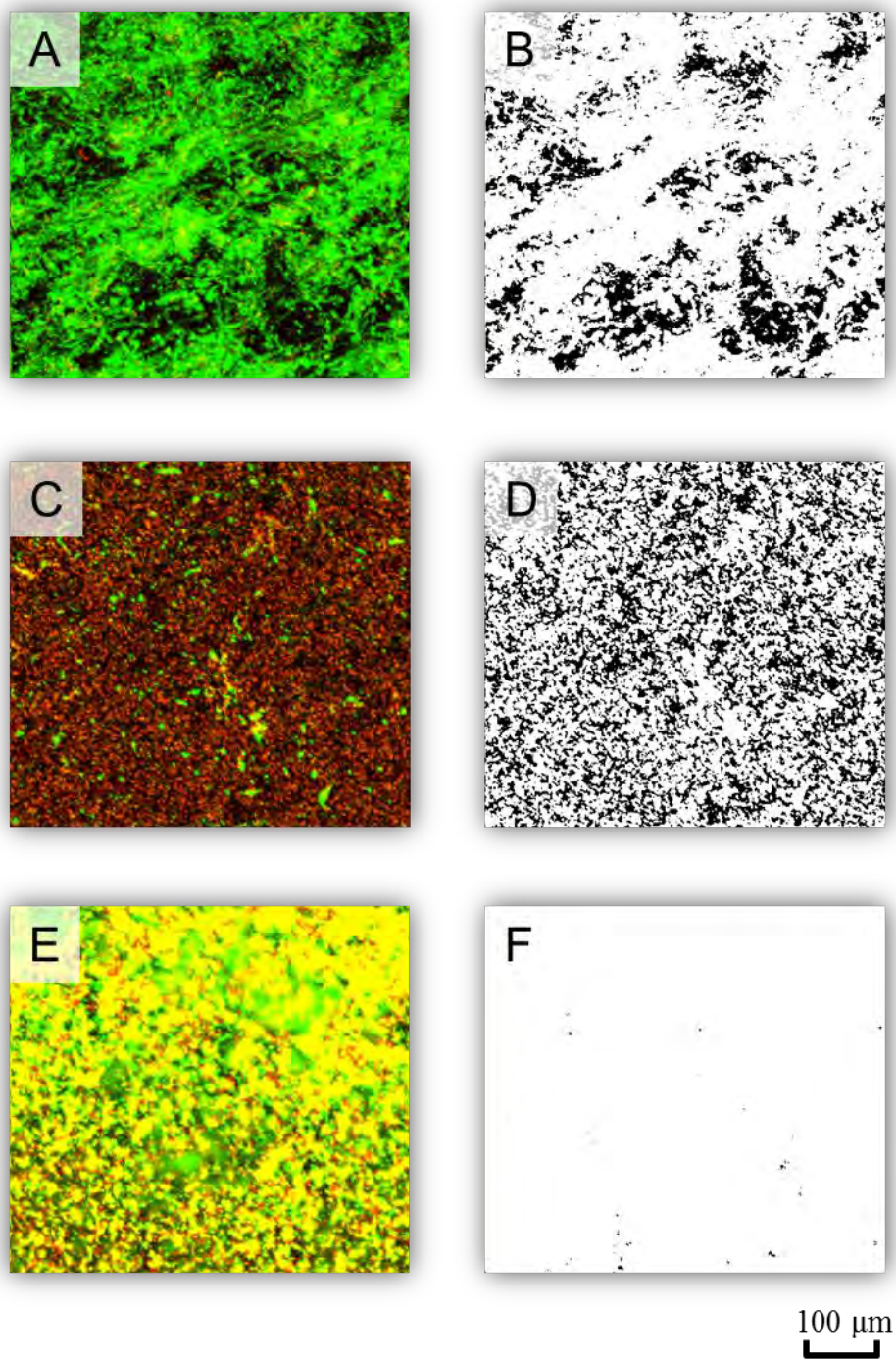
**Fig. B-13 3-dimensional images of biofilm formed by R2  $\Delta$ ahyI strain (with C4-HSL initially added) obtained for surface coverage analysis**

(A) Result after 24 h incubation. (C) Result after 72 h incubation. (E) Result after 120 h incubation. (B), (D), and (F) are binarization images of (A), (C), and (E), respectively.



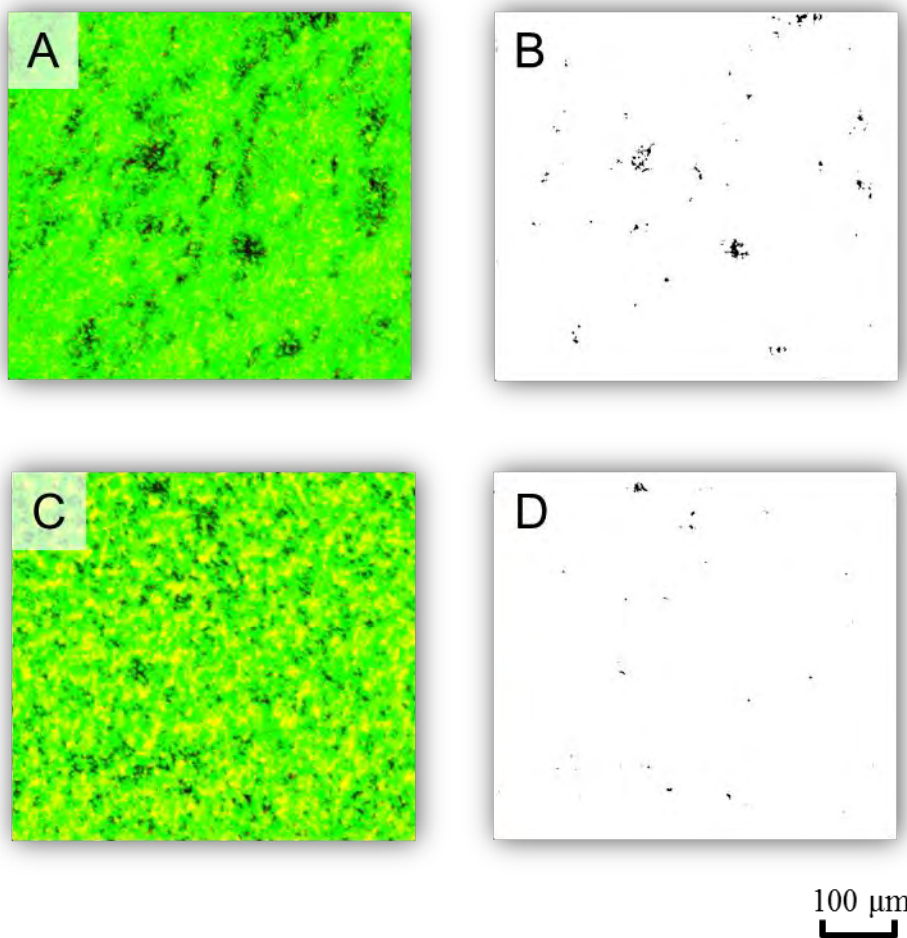
**Fig. B-14 3-dimensional images of biofilm formed by R2 wild type strain obtained for surface coverage analysis (gas-liquid interface)**

(A) Result after 24 h incubation. (C) Result after 72 h incubation. (E) Result after 120 h incubation. (B), (D), and (F) are binarization images of (A), (C), and (E), respectively.



**Fig. B-15 3-dimensional images of biofilm formed by R2  $\Delta$ ahyI strain obtained for surface coverage analysis (gas-liquid interface)**

(A) Result after 24 h incubation. (C) Result after 72 h incubation. (E) Result after 120 h incubation. (B), (D), and (F) are binarization images of (A), (C), and (E), respectively.



**Fig. B-16 3-dimensional images of biofilm formed by R2  $\Delta$ ahyI strain obtained for surface coverage analysis (gas-liquid interface, C4-HSL initially added)**

(A) Result after 24 h incubation. (C) Result after 72 h incubation. (B) and (D) are binarization images of (A) and (C), respectively.

**Table B-1 Result of biofilm thickness estimation**

Peak derived from calculation in Fig. B-5 ~ Fig. B-10 was applied for biofilm thickness estimation. Results are represented in bar graphs in Fig. 3-27 (Chapter 3).

		R2 wild type		R2 $\Delta$ ahyI		R2 $\Delta$ ahyI+AHL	
		bulk	int	bulk	int	bulk	int
24 h	peak 1	67.64	82.33		83.55	105.43	103.45
	peak 2	27.85	47.80		40.43	44.73	35.67
	distance	39.8	34.5		43.1	60.7	67.8
72 h	peak 1	73.22	96.59	52.82	79.18	78.32	90.88
	peak 2	40.15	45.28	19.62	31.67	38.10	35.80
	distance	33.1	51.3	33.2	47.5	40.2	55.1
120 h	peak 1	78.40	104.78	59.54	68.27	75.26	
	peak 2	41.65	49.48	28.67	7.59	37.63	
	distance	36.8	55.3	30.9	60.7	37.6	

[ $\mu$ m]

**Table B-2 Result of surface coverage analysis**

Number of white pixels in binarized images of Fig. B-11 ~ Fig. B-16 was divided by total pixels to calculate the surface coverage. Results are represented in bar graphs in Fig. 3-28 (Chapter 3).

		R2 wild type		R2 $\Delta$ ahyI		R2 $\Delta$ ahyI+AHL	
		bulk	int	bulk	int	bulk	int
24 h	white pixels	89829	91667	5522	144136	175416	175251
	total pixels	176039	176039	176039	176039	176039	176039
	coverage	51.03%	52.07%	3.14%	81.88%	99.65%	99.55%
72 h	white pixels	162224	175522	3895	116336	107745	175853
	total pixels	176039	176039	176039	176039	176039	176039
	coverage	92.15%	99.71%	2.21%	66.09%	61.21%	99.89%
120 h	white pixels	142616	175986	93348	175893	172109	
	total pixels	176039	176039	176039	176039	176039	
	coverage	81.01%	99.97%	53.03%	99.92%	97.77%	